



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A01H 5/00	A1	(11) 国際公開番号 WO96/38034 (43) 国際公開日 1996年12月5日(05.12.96)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 (30) 優先権データ 特願平7/133741 1995年5月31日(31.05.95) JP 特願平7/285401 1995年11月1日(01.11.95) JP 特願平8/52010 1996年3月8日(08.03.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社(KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者：および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 小川俊也(OGAWA, Toshiya)[JP/JP] 吉岡正陽(YOSHIOKA, Masaharu)[JP/JP] 石田 功(ISHIDA, Isao)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, RU, US, ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : VIRUS-RESISTANT PLANT EXPRESSING 2',5'-OLIGOADENYLIC ACID SYNTHETASE AND RIBONUCLEASE L ORIGINATING IN ANIMAL CELLS AND PROCESS FOR CONSTRUCTING THE SAME (54) 発明の名称 動物細胞由来2',5'オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLを発現するウイルス抵抗性植物及びその作製法 (57) Abstract A process for constructing a plant resistant to an RNA virus which comprises integrating a DNA sequence encoding a 2',5'-oligoadenylic acid synthetase originating in animal cells and another DNA sequence encoding a ribonuclease L originating in animal cells into a plant chromosome followed by the expression therein, and the plant thus constructed. The present invention is applicable widely to the development of virus-resistant plant varieties.		

(57) 要約

本発明は、動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、RNAウイルスに抵抗性を持つ植物を作出する方法、及びそれによって作出された植物に関する。

本発明は、ウイルス抵抗性植物品種の育成に広く応用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GB	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	IE	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CJ	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KR	韓国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CN	中国	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CU	キューバ			NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
CZ	チェコ共和国						

明 細 書

動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLを発現するウイルス抵抗性植物及びその作製法

技術分野

本発明は、遺伝子組換え技術を用いて動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLを発現するウイルス抵抗性植物を作出する技術に関する。更に具体的には、本発明は、動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素及びリボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、ウイルスに対して抵抗性を持つ植物を作出する方法、及びそのような方法で得られたウイルス抵抗性植物に関するものである。

背景技術

ウイルスは植物にとって大きなストレス源の一つであり、ウイルス病害によって作物の産地が移動したり、品種が更新されたりすることも稀ではない。現在のところ、ウイルスに直接作用する有効な薬剤はなく、ウイルス感染した植物は焼却処分されている。ウイルス抵抗性は育種の重要な目標であるが、野生種・近縁種の中に抵抗性遺伝子源が見つからない場合、従来 of 交配等による育種技術ではウイルス抵抗性品種の育成は不可能であった。

このような従来の育種技術の欠点を補う方法として、近年遺伝子組換え技術を用いて植物にウイルス抵抗性を与える方法が開発された。遺伝子組換え技術は、前記のような交配の壁を超えた遺伝子導入を可能にした。また、既存品種にウイルス抵抗性遺伝子のみを導入することができ、育種にかかる時間を大幅に短縮できるようになった。

遺伝子組換え技術を用いたウイルス抵抗性植物の作出方法としては、ウイルス外被蛋白質、ウイルス複製蛋白質をコードする遺伝子、アンチセンス遺伝子、サテライトRNAをコードする遺伝子を植物で発現させる方法等が報告されている(例えば、Arch. Virol., 115, 1, 1990)。これらの方法は、一種のウイルスあるいは近縁のウイルスに対してのみ抵抗性を与えるものであり、多種類のウイル

スに対して抵抗性を与える方法については未だ開発途上にある。

多種類のウイルスに対して同時に抵抗性を与える方法として、二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼを用いた方法（国際公開 WO 93/20686）、2',5' オリゴアデニル酸合成酵素を用いた方法（Bio/Technology, 11, 1048, 1993）が報告されている。

2',5' オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子を用いた方法については、得られる形質転換植物体のウイルス抵抗性が非常に弱いという報告もされている（The proceedings of XVIIth Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, 1995）。即ち、2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をタバコ植物（Samsun株）に導入し、2',5' オリゴアデニル酸合成酵素活性を発現する植物にタバコモザイクウイルス（以下「TMV」という。）OM株を接種したところ、対照と比較して病徴の発現の遅れは全く認められなかった。また、植物細胞ではリボヌクレアーゼL類似分子の存在が認められないという報告も多い（Biochem. Biophys. Res. Commun., 108, 1243, 1982; J. Biol. Chem., 259, 3482, 1984; The proceedings of XVIIIth Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, 1995）。

発明の開示

本発明者らは、動物細胞由来の2',5' オリゴアデニル酸合成酵素遺伝子とリボヌクレアーゼL遺伝子を同時に植物体で発現させることにより2',5' オリゴアデニル酸合成酵素のみによるウイルス抵抗性よりも顕著に抵抗性が増すことを期待して鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成した。

本発明は、動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素（以下「2-5Aase」という。）をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼL（以下「RNaseL」という。）をコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、RNAウイルスに抵抗性を持つ植物を作出する方法、及びそのような方法で作出されたウイルス抵抗性植物に関するものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列

動物細胞において、インターフェロンによって誘導される抗ウイルス状態の一

部を担っているものとして、2-5Aase/RNaseLシステムの存在が知られている (Annu. Rev. Biochem., 51, 251, 1982)。2-5Aase 蛋白質は二本鎖RNAを認識して活性化され、基質であるアデノシン3 リン酸 (以下「ATP」という。) より2',5' オリゴアデニル酸 (通常トライマー又はテトラマーで、以下「2-5A」という。) を合成する酵素活性を持つ蛋白質をいう。2-5Aase をコードする cDNA は、ヒト (EMBO J., 4, 2249, 1985)、マウス (J. Biol. Chem., 266, 15293, 1991; Nuc. Acids. Res., 19, 1919, 1991)、ラット (EMBL Acc. No. Z18877) からクローニングされている。また、本発明者らは、今回ウシから2-5Aase をコードする cDNA をクローニングすることに成功した。2-5Aase をコードするDNA配列としては、これらのものに限らず、前記活性を有している限り本発明に用いることができる。つまり、他の動物種からクローニングしたもの、更にこれらにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入が加わったものであっても、前記2-5Aase 活性を持つものであれば本発明に用いることができる。RNaseL 蛋白質は2-5Aと結合する活性を持ち、2-5Aが結合することによりRNA分解活性を示すものをいう。RNaseLをコードする cDNA は、ヒト (Cell, 72, 753, 1993) からクローニングされている。また、本発明者らは、今回ウシからRNaseL をコードする cDNA をクローニングすることに成功した。RNaseLをコードするDNA配列としては、これらのものに限らず、他の動物種からクローニングしたもの、これらにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入が加わったものであっても、前記RNaseL活性を持つものであれば本発明に用いることができる。

以下に示す実施例においては、2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列として、ヒト又はウシ由来の cDNA クローンを使用したが、本発明に使用し得る2-5Aase、RNaseLをコードするDNA配列は、このヒト又はウシ由来2-5Aase、RNaseLに限定されるものではないことはいうまでもない。

また、一般にあるDNA配列があるアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする場合、一つのアミノ酸配列に対応する遺伝コード (コドン) が複数存在するために、一つのアミノ酸配列に対応するDNA配列が複数個存在する (縮重異性体)。本発明に用いる2-5Aase、RNaseLをコードするDNA配列においても、それがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない範囲において、任意

の遺伝コードを用いることができることはいうまでもない。

(2) 2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列の発現

2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列が遺伝子組換え植物中で発現するためには、少なくともこのDNA配列がRNAに転写されることが必要である。植物染色体中に外来遺伝子を組み込む場合、ある確率によって染色体上の被転写領域に組み込まれることが知られている (EMBO J., 6, 3891, 1987) ので、2-5Aase 又はRNaseLをコードするDNA配列を単独に組み込んで発現させることも可能である。しかし、好ましくはあらかじめ適当なプロモーター及びターミネーター配列を連結してから組み込むことが好ましい。

この場合、プロモーターとしては、これまでに植物細胞中で機能することが知られているあらゆるプロモーター、具体的にはリブローソム-1,5-2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする遺伝子のプロモーター、ノバリン合成酵素遺伝子のプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35S-RNAを生じるプロモーター (CaMV 35Sプロモーター) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2358, 1986; Plant Cell Rep., 4, 355, 1985; Cell, 30, 763, 1982; Nature, 313, 810, 1985) 等を用いることができる。ターミネーターとしても、これまでに植物細胞中で機能することが知られているあらゆるターミネーターを使用することができる。具体的には、ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター、オクトピン合成酵素遺伝子のターミネーター (J. Mol. Appl. Gen., 1, 561, 1982; EMBO J., 3, 835, 1984) 等を利用することができる。

(3) 2-5Aase 及びRNaseLをコードするDNA配列の植物への組み込み

植物細胞に2-5Aase 又はRNaseLをコードするDNA配列を導入するには、すでに報告され確立された種々の方法、例えばAgrobacterium tumefaciens のTiプラスミドをベクターとして用いる方法や、植物片や植物プロトプラストに直接DNAを導入する方法等を、目的とする植物種に応じて適宜用いることができる (例えば、"Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual", Draper, J. et al., Blackwell Scientific Publications, 1988)。形質転換した植物組織又は細胞を植物種に応じた適当な条件下で組織培養することにより、形質転換植物体を再生することができる。2-5Aase とRNaseL

を同時に発現する形質転換植物体を得る方法としては、2-5Aase 又はRNaseLを導入した植物体でのそれぞれ目的遺伝子の発現を調べ、それぞれの遺伝子を発現している植物体を交配する方法が考えられる。また、2-5Aase 又はRNaseLを導入した形質転換体を再度、他の遺伝子を用いて形質転換する方法、あるいは2-5Aase とRNaseLを同時に形質転換する方法も可能である。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト由来2-5Aase、RNaseL cDNAを含む植物形質転換ベクターを示す図である。

NOSpro ノバリン合成酵素遺伝子プロモーター
 NOSterm ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター
 CaMV35S カリフラワーモザイクウイルス35S プロモーター
 NPTII ネオマイシン耐性遺伝子
 HYG ハイグロマイシン耐性遺伝子
 2-5Aase 2-5Aase cDNA
 RNaseL(T) 部分長RNaseL cDNA
 RNaseL(F) 全長RNaseL cDNA
 RB 右ボーダー
 LB 左ボーダー

図2は、2-5Aase 導入形質転換タバコ（キサランチnc株）の葉中の2-5Aase の活性を示す図である。

control 非形質転換体
 2-5Aase#11b 形質転換体
 2-5Aase#12a 形質転換体
 2-5Aase#13b 形質転換体

図3は、部分長RNaseL導入形質転換タバコ（キサランチnc株）の葉中のRNaseLの活性を示す図である。

control 非形質転換体
 RNaseL#H1 形質転換体

RNaseL#H2 形質転換体

RNaseL#H3 形質転換体

RNaseL#H4 形質転換体

Spleen マウス脾臓粗抽出液

図4は、全長RNaseL導入形質転換体タバコ（キサンチnc株）の葉中のRNaseLの活性を示す図である。

control 非形質転換体

RNaseL (F) #23a 形質転換体

RNaseL (F) #14a 形質転換体

RNaseL (F) #27a 形質転換体

RNaseL (F) #12b 形質転換体

RNaseL (F) #30b 形質転換体

Spleen マウス脾臓粗抽出液

図5は、CMV (Y株) 接種後の2-5Aase 導入タバコ (2-5Aase#11b) と2-5Aase+部分長RNaseL導入タバコ (2-5Aase#11b+RNaseL#H1, 2-5Aase#11b+RNaseL#H4) の非接種上葉に病徴が見られた植物体の割合(%)を示す図である。

図6は、CMV (Y株) 接種タバコ葉中のCMV 外被蛋白質の検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

2-5Aase#11b 2-5Aase 導入タバコ

2-5Aase#11b+RNaseL#H4 2-5Aase+部分長RNaseL導入タバコ

図7は、CMV Y株感染3日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase#13b

B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

C RNaseL (F) #23a

D 2-5Aase#13b

E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a

F RNaseL (F) #27a

- G 2-5Aase#13b
- H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- I RNaseL (F) #30b
- ↑ 接種葉

図8は、CMV Y株感染12日後における2-5Aase+RNaseL (F)導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F)導入タバコの全身病徴の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a
- F RNaseL (F) #27a
- G 2-5Aase#13b
- H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- I RNaseL (F) #30b

図9は、各形質転換タバコの感染5日後の接種葉の壊死斑部分と同一の葉で壊死斑を形成していない部分におけるCMVの検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

- 1 2-5Aase#13b
- 2 RNaseL (F) #23a
- 3 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a 壊死斑形成部分
- 4 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a 壊死斑のない部分
- 5 RNaseL (F) #30b
- 6 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b 壊死斑形成部分
- 7 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b 壊死斑のない部分
- 8 RNaseL (F) #27a
- 9 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a 壊死斑形成部分
- 10 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a 壊死斑のない部分

図10は、各形質転換タバコの感染12日後の非接種上葉におけるCMV の検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

- 1 非形質転換体
- 2 2-5Aase#13b
- 3 RNaseL (F) #23a
- 4, 5 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- 6 RNaseL (F) #27a
- 7, 8 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a
- 9 RNaseL (F) #30b
- 10, 11 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

図11は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種5日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- F RNaseL (F) #30b
- ↑ 接種葉

図12は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種16日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの全身病徴の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- F RNaseL (F) #30b

図13は、PVY T 株感染葉粗汁液の接種5日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- F RNaseL (F) #30b
- ↑ 接種葉

図14は、PVY T 株感染葉粗汁液の接種14日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの全身病徴の有無を表す生物の形態を示す写真である。

- A 2-5Aase#13b
- B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- C RNaseL (F) #23a
- D 2-5Aase#13b
- E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a
- F RNaseL (F) #27a
- G 2-5Aase#13b
- H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b
- I RNaseL (F) #30b

図15は、各形質転換タバコの感染5日後の非接種上葉 (A) 及び感染10日後の非接種上葉 (B) におけるPVY T 株の検出のための電気泳動の結果を示す写真である。

- 1 非形質転換体
- 2, 3 2-5Aase#13b
- 4, 5 RNaseL (F) #23a
- 6, 7 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

8, 9 RNaseL (F) #30b

10, 11 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

図16は、PVY 0 株感染葉粗汁液の接種3日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase#13b

B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

C RNaseL (F) #23a

D 2-5Aase#13b

E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a

F RNaseL (F) #27a

G 2-5Aase#13b

H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

I RNaseL (F) #30b

↑ 接種葉

図17は、PVY 0 株感染葉粗汁液の接種15日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの全身病徴の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase#13b

B 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a

C RNaseL (F) #23a

D 2-5Aase#13b

E 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a

F RNaseL (F) #27a

G 2-5Aase#13b

H 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

I RNaseL (F) #30b

図18は、各形質転換タバコの感染5日後の接種葉 (A) 及び感染6日後の非接種上葉 (B) におけるPVY 0 株の検出のための電気泳動の結果を示す写真であ

る。

- 1 非形質転換体
- 2 2-5Aase#13b
- 3 RNaseL (F) #23a
- 4, 5 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a
- 6 RNaseL (F) #27a
- 7, 8 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a
- 9 RNaseL (F) #30b
- 10, 11 2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b

図19は、ウシ2-5Aase cDNAの塩基配列とそれから予測されるアミノ酸配列を示す図である。

図20は、ウシRNaseL cDNAの塩基配列とそれから予測されるアミノ酸配列を示す図である。

図21は、2-5Aase 導入形質転換タバコ（サムソン）の葉中の2-5Aase の活性を示す図である。

- | | |
|---------|-----------------|
| control | 非形質転換体 |
| #13-4 | 2-5Aase 導入形質転換体 |
| #13-5 | 2-5Aase 導入形質転換体 |
| #13-7 | 2-5Aase 導入形質転換体 |
| #13-9 | 2-5Aase 導入形質転換体 |
| #13-10 | 2-5Aase 導入形質転換体 |
| #13-11 | 2-5Aase 導入形質転換体 |

図22は、RNaseL(F) 導入形質転換タバコ（サムソン）の葉中のRNaseL活性を示す図である。

- | | |
|---------|--------------------|
| control | 非形質転換体 |
| #57-4a | RNaseL (F) 導入形質転換体 |
| #57-6b | RNaseL (F) 導入形質転換体 |
| #57-11 | RNaseL (F) 導入形質転換体 |
| #58-7 | RNaseL (F) 導入形質転換体 |

#58-11 RNaseL (F) 導入形質転換体

#58-18 RNaseL (F) 導入形質転換体

図23は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種3日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの壊死斑の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase (S) #13-10

B 2-5Aase (S) #13-10+RNaseL (S) #57-6b

C RNaseL (S) #57-6b

↑ 接種葉

図24は、CMV Y 株感染葉粗汁液の接種10日後における2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2-5Aase 導入タバコ及びRNaseL (F) 導入タバコの全身病徴の有無を表す生物の形態を示す写真である。

A 2-5Aase (S) #13-10

B 2-5Aase (S) #13-10+RNaseL (S) #57-6b

C RNaseL (S) #57-6b

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて更に具体的に本発明を説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

以下の実施例では、2-5Aase 及びRNaseLのDNA配列としてヒト由来のcDNAを使用し、植物でこの遺伝子を発現させるためのプロモーターとしてはCaMV 35Sプロモーターを使用した。2-5Aase cDNAの発現には、pBI121ベクター (EMBO J., 6, 3901, 1987) 上のβグルクロニダーゼ遺伝子 (βGUS) と2-5Aase cDNAを入れ替えて使用した。RNaseL cDNAの発現には、pBIB-HYGベクター (ケルン大学遺伝研究所、Dr. Detlef Becker より入手) へ、CaMV 35SプロモーターをRNaseL cDNAの5'上流につなげたDNA配列を導入したものを使用した。

本発明の効果を確認するための宿主植物としてタバコ (キサンチnc株) を使用し、アグロバクテリウムを介してリーフディスク法によるか、又はタバコプロト

プラストを用いてエレクトロポレーション法によってタバコ形質転換体を得た (Plant genetic transformation and gene expression; a laboratory manual, Draper, J. et al., Blackwell Scientific Publications, 1988)。

形質転換体中の2-5Aase cDNA及びRNaseL cDNA発現の有無は、形質転換体植物の葉から粗抽出液を調製し、それぞれ2-5Aase 活性 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984)、RNaseL活性 (Anal. Biochem., 144, 450, 1985) を測定することによって調べた。

2-5Aase cDNAとRNaseL cDNAを同時に発現している形質転換体タバコは、2-5Aase 活性を発現しているタバコ植物とRNaseL活性を発現しているタバコ植物を交配することによって得た。2-5Aase のみを発現しているタバコ植物、2-5Aase とRNaseLの両方を発現しているタバコ植物にキュウリモザイクウイルス (CMV Y 株) を感染させたところ、2-5Aase のみを発現しているタバコ植物に比較して有意に高いウイルス抵抗性を示した。

(実施例1) 形質転換植物作製に用いるプラスミドの作製 (図1)

報文 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4904, 1983) に記載されているヒト由来2-5Aase のDNA配列 (配列番号1) を基に、cDNAクローニングのためのプローブ (配列番号2) を作製した。cDNAクローニングのためのライブラリーは、HeLa細胞 (東京大学薬学部生理化学教室、榎本助教授より入手) を200units/ml のヒトβインターフェロン (Paesel Lorei GMBH & CO, Frankfurt) で12時間処理した後、mRNAを抽出し、ファルマシアcDNA合成キットを用いてcDNAを作製し、Lambda gt10 ベクターにつなげて作製した。2-5Aase mRNAは2種 (1.6kb と1.8kb) あることが報告されているが、植物発現用には1.6kb mRNAに対するcDNAを用いた。2-5Aase cDNA (EcoRI 断片) をpBI121のβGUS と入れ替え、植物発現用プラスミドpBI2-5Aaseを作製した。

ヒト由来RNaseL cDNAについては、報文 (Cell, 72, 753, 1993) に記載されているDNA配列 (配列番号3) を基にプローブ (配列番号4) を作製し、ヒト脾臓cDNAライブラリー (Clontech社) をスクリーニングすることによって取得した。ヒト脾臓cDNAライブラリーから2種、部分長 (C末アミノ酸61残基欠いているもの) と全長のcDNAクローンを得た。2種のRNaseL cDNA

(HindIII-EcoRI 断片) のN末側にCaMV 35Sプロモーターをつなげ、これをpBIB-HYGベクターのHindIII-SacI断片と入れ替え、植物発現用プラスミドを作製した。部分長RNaseLを含むもの、全長RNaseLを含むものを、それぞれpBIBRNaseL(T)、pBIBRNaseL(F) という。

(実施例2) タバコ植物の形質転換

形質転換には、タバコ (*Nicotiana tabacum*) キサンチnc株 (*Xanthi nc*) を用いた。図1に示したプラスミドpBI2-5Aase又はpBIBRNaseL(F) をそれぞれ、エレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株に導入した。リーフディスク法によりタバコ葉片にアグロバクテリウムを感染させ、250 μ g/mlクラフォラン、100 μ g/mlカナマイシン又は20 μ g/mlハイグロマイシン入りMS-B5 培地 [Murashige & Skoog 基本培地 (Physiol. Plant., 15, 473, 1962) にB5ビタミンを添加したもの] 上に置床して形質転換体を選択した。シュートが出てきたら、ホルモンフリーのMS培地に移し発根させた。得られた形質転換植物体は、プラントボックスにて無菌インビトロカルチャーした後、鉢上げして自家受粉又は交配 (2-5Aase + RNaseL) してR1種子を得た。

プラスミドpBIBRNaseL(T) は、タバコ葉より調製したプロトプラスト細胞へエレクトロポレーションによって導入された。プロトプラストは、タバコ (キサンチnc株) 葉肉細胞から酵素液 [1%Cellulase Onozuka RS (ヤクルト社), 1%Driselase (協和発酵工業社), 0.1%Pectolyase (Seihshin Pharmaceutical 社), 0.4M D-マンニトール (pH5.7)] により室温で一晩処理して調製した。冷0.4MD-マンニトールでプロトプラストを3回洗浄して、 1×10^8 個の細胞を約10 μ g のDNAプラスミドを含む0.8mlのエレクトロポレーションバッファー (0.3MD-マンニトール, 5mM 2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸 pH5.8, 70mM KCl) に懸濁し、エレクトロポレーションキュベット (Bio-rad 社, 0.4cm 幅) に移して、125 μ F, 300V で加電した。エレクトロポレーションしたプロトプラストは、1%アガロースを含むスフェロプラスト培地 (1%スクロース, 0.4MD-マンニトール, 0.2 μ g/ml 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸を含む Murashige & Skoog 培地) 中で1週間、28℃、暗黒下で培養し、次にハイグロマ

イシン (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) による形質転換体の選択を行った。得られたコロニーからシュートが形成された後、ホルモンフリー培地に移して形質転換植物体を得た。得られた形質転換植物体は、プラントボックスにて無菌インビトロカルチャーした後、鉢上げし、2-5Aase 植物と交配して F₁ 種子を得た。

(実施例 3) 2-5Aase 導入形質転換タバコ中の 2-5Aase 活性の検出 (図 2)

インビトロカルチャーしたタバコ葉、インターフェロン処理した HeLa 細胞からの粗抽出液を Wells らの方法 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984) によって調製した。葉の湿重量を測定し、液体窒素中で粉碎し、等量の溶解バッファー (0.5% Nonidet P-40, 90mM KCl, 1mM 酢酸マグネシウム, 10mM Hepes pH7.6, 2mM 2-メルカプトエタノール, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペブチン, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ肺アプロチニン (bovine lung aprotinin), 50 μM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシン阻害剤) を加え、テフロンベッスルホモジナイザーによってホモジナイズし、15,000rpm, 4°C, 20min で 2 回遠心して上清を取った。葉粗抽出液 1ml (HeLa 細胞粗抽出液の場合は、粗抽出液を溶解バッファーで 10 倍に希釈したもの) に 40 μl の polyI:polyC セルロース懸濁液を加えて、4°C で 2 時間反応させた後、洗浄バッファー (20mM Hepes pH7.0, 10mM 酢酸マグネシウム, 5mM KCl) で 3 回遠心洗浄して 0.2 μl ^{32}P -rATP (10mCi/ml, 3000Ci/mol, NEN 社) を含む反応混合物 (20mM Hepes pH7.0, 20% グリセリン, 7mM 2-メルカプトエタノール, 2mM ATP, 5mM KCl, 10mM 酢酸マグネシウム) 50 μl に懸濁し、30°C で一晚 (16~20 時間) 反応させた。反応液中に生成された ^{32}P 標識オリゴアデニル酸は、Wells らの方法 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984) に従って DEAE セルロースを用いて精製して液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。polyI:polyC セルロースは、Wells らの方法 (J. Biol. Chem., 259, 1363, 1984) によって作製した。粗抽出液中の蛋白量は Bio-rad 社のプロテインアッセイキットによって測定した。

非形質転換体の値に対して、2-5Aase 形質転換タバコは有意に高い活性を示した。また、HeLa 細胞粗抽出液では、219nmol/mg 蛋白質/4h であり、2-5Aase タバコに比べ非常に高い活性であった。

(実施例 4) RNaseL 導入形質転換タバコ中の RNaseL 活性の検出 (図 3、図 4)

インビトロカルチャーしたタバコ葉、マウス脾臓からの抽出液をSilverman らの方法 (J. Biol. Chem., 263, 7336, 1988) によって調製した。葉の湿重量を測定し、液体窒素中で粉碎した後、等量のハイポバッファー (0.5% Nonidet P-40, 20mM Hepes pH7.6, 10mM酢酸カリウム, 15mM酢酸マグネシウム, 1mM ジチオトレイトール (DTT), 100 μ M PMSF, 20 μ g/mlロイペプチン) を加えてポリトロンによってホモジナイズした。ホモジネートを15,000rpm, 4°C, 20min で2回遠心して上清を取り粗抽出液とした。2-5A (5'-3'リン酸テトラマー、生化学工業社) 及びコントロール (ATP) セルロースは、polyI:polyC セルロースと同様な方法 (実施例3参照) で調製した。1.0ml タバコ葉 (全長RNaseLタバコの場合は0.5ml)、マウス脾臓抽出液 (マウス脾臓抽出液はハイポバッファーで4倍に希釈されたもの) に2.5 μ l の0.1M ATP、7.5 μ l の3M KClを加え、25 μ l ATPセルロース懸濁液と混ぜ、4°Cで1時間反応させた後、遠心し上清を取り25 μ l 2-5Aase セルロース懸濁液を加え、4°Cで2時間反応させ上清を捨てた。反応させた後、遠心して沈殿させたATPセルロース、2-5Aase セルロースは、バッファーA (11.5mM Hepes pH7.6, 104mM KCl, 5.8mM酢酸マグネシウム, 8.8mM 2-メルカプトエタノール, 10 μ M PMSF, 20 μ g/mlロイペプチン) で3回遠心洗浄した後、50 μ l バッファーAで懸濁した。³²P ラベル化polyU 基質をSilverman の方法 (Anal. Biochem., 144, 450, 1985) に従って調製した。20 μ l の懸濁液と20 μ l の反応液 (4 μ l の 100 μ M 2-5A, 2 μ l の5×バッファーA, 0.25 μ l の³²P-polyUpCp, 0.05 μ l の10 μ M cold polyU, 13.7 μ l の水) を混ぜ、37°Cで一晩 (16時間) 反応させた後、50 μ l の10mg/ml 酵母RNA、1ml トリクロロ酢酸 (TCA) を加え反応を停止させた。氷上で15min 以上放置した後、Whatman GF/Cフィルター上にTCA-不溶性画分をトラップして、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。2-5A依存的RNase 活性 (RNaseL活性) は、ATPセルロース画分の放射活性から2-5Aセルロース画分の放射活性を引いたものとして表した。粗抽出液中の蛋白量はBio-rad 社のプロテインアッセイキットによって測定した。非形質転換タバコの値は0以下の値を示したのに対して、部分長RNaseL形質転換タバコでは+の値を示した (図3)。全長RNaseL形質転換タバコでは、部分長RNaseLよりも更に高い活性を示した (図4)。

(実施例5) キュウリモザイクウイルス (CMV Y 株) 感染実験 (図5、図6)

R1種子 (2-5Aase 導入タバコ、2-5Aase+RNaseL (T) 導入タバコ) を 800 μ g/ml カナマイシン又は 800 μ g/ml カナマイシン + 100 μ g/ml ハイグロマイシンを含む MS寒天培地上に播種し、2-5Aase 導入タバコ植物体、2-5Aase + RNaseL導入植物体を選択した。幼植物は鉢上げした後、葉の一部からDNAを抽出 (Nuc. Acids Res., 21, 4153, 1993) してPCR によって2-5Aase 又はRNaseL c DNAの存在を確認した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体にCMV Y 株 3 μ g/mlを接種し、ウイルス感染後の病徴の出現を観察した。各形質転換体について、5個体を用いた。感染後、非接種上葉に病徴が現われた植物の割合を%で示した。活性を確認した部分長RNaseLタバコ (実施例3、図3参照) と2-5Aase タバコを交配して得た2-5Aase+ RNaseL (T) 導入タバコは、2-5Aase のみを導入した形質転換タバコに対して、有意に強いウイルス抵抗性を示した (図5)。感染8日後の形質転換タバコ (2-5Aase#11b, 2-5Aase#11b+RNaseL#H4) の非接種上葉を各形質転換体、5個体ずつから切り取り、5倍量のSDS バッファー (2%SDS, 80mM Tris-HCl pH6.8, 2%2-メルカプトエタノール, 10% グリセリン) で全蛋白質を抽出し、各サンプルをSDS 電気泳動用サンプルバッファーで100倍に希釈して、10 μ l をSDS ポリアクリルアミド電気泳動で分画した。ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (ミリポア社) へ蛋白質を転写して、抗CMV ウサギ血清 (約2000倍希釈) とプロテインA-アルカリホスファターゼ発色により感染植物葉中のCMV を検出した。2-5Aase#11b タバコの非接種上葉では、強いCMV 蓄積がサンプリングした5個体全てに見られたのに対して、2-5Aase#11b+RNaseL#H4 タバコでは、5個体中で2個体のみしか見られなかった (図6)。

(実施例6) キュウリモザイクウイルス (CMV Y 株) 感染実験

R1種子 (2-5Aase 導入タバコ、1系統 (2-5Aase#13b) ; RNaseL (F) 導入タバコ、3系統 (RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #27a、RNaseL (F) #30b))、F1種子 (2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、3系統 (2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b)) を100 μ g/mlハイグロマイシンを含むMS寒天培地上に播種し、RNaseL (F) 導入植物体を選抜した。幼植物は鉢上げした後、葉の一部からDNAを抽出してPCR によって

2-5Aase 又はRNaseL (F) cDNAの存在を確認した(実施例5参照)。鉢上げした後、約4週間経過した植物体にCMV Y 株15 μ g/mlを接種し、ウイルス感染後の経過、病徴の出現を観察した。各形質転換体の系統について5個体を接種実験に供した。その結果、感染3日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壊死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壊死斑は観察されなかった(図7)。更に、感染後12日目では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは、すべての系統、すべての個体で非接種上葉で病徴が観察されたが、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、すべての系統、すべての個体の非接種上葉で病徴は観察されなかった(図8)。各形質転換タバコの感染5日後の接種葉の壊死斑部分と同一の葉で壊死斑を形成していない部分、及び感染12日後の非接種上葉より、実施例5で示した方法で全蛋白質を抽出し、感染植物葉中のCMV を検出した。その結果、感染5日後の接種葉では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは大量のCMV が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、壊死斑部分において少量のCMV が検出されたものの、壊死斑を形成していない部分ではCMV は検出されなかった(図9)。また、感染12日後の非接種上葉においても、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは大量のCMV が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、CMV は全く検出されなかった(図10)。これらのことから、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、接種葉においてCMV 感染によって壊死斑を形成し、感染された細胞が壊死し、それによってウイルスが広がるのを防ぎ、結果として全く病徴が現われなかったと考えられる。

(実施例7) 接種源としてウイルス感染植物葉粗汁液を用いたキュウリモザイクウイルス (CMV Y 株) 感染実験

R1種子(2-5Aase 導入タバコ、1系統(2-5Aase#13b) ; RNaseL (F) 導入タバコ、2系統(RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #30b))、F1種子(2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、2系統(2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b))を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体にCMV Y 株を感染させ病徴を呈したタバコ

葉 (Xanthi nc 株) を、葉の重量あたり10倍量の抽出緩衝液 (10mMリン酸緩衝液 (pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール) で摩砕し、その粗汁液を鉢上げした後約2週間経過した植物体に接種し、接種後の経過、病徴の出現を観察した。各形質転換体の系統について2個体を接種実験に供した。その結果、実施例6で示した、15 μ g/mlの純化ウイルスを接種した際と同様の経過が観察された。つまり、接種3日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壊死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壊死斑は観察されなかった。接種5日後の接種葉を図11に示した。更に、感染12日後では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは、すべての系統、すべての個体で非接種上葉で病徴が観察されたが、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、すべての系統、すべての個体の非接種上葉で病徴は観察されなかった。接種16日後の植物体を図12に示した。このことは、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコのCMV Y 株に対する抵抗性反応は、接種源の形状 (純化ウイルス、感染葉粗汁液) によって相違しないことを示す。

(実施例8) ポテトウイルス Y T株 (PVY T 株) 感染実験

R1種子 (2-5Aase 導入タバコ、1系統 (2-5Aase#13b) ; RNaseL (F) 導入タバコ、3系統 (RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #27a、RNaseL (F) #30b))、F1種子 (2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、3系統 (2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b)) を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体にPVY T 株を感染させ病徴を呈したタバコ葉 (Samsun株) を、葉の重量あたり10倍量の抽出緩衝液 (10mMリン酸緩衝液 (pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール) で摩砕し、その粗汁液を鉢上げした後約2週間経過した植物体に接種し、接種後の経過、病徴の出現を観察した。各形質転換体の系統について5から7個体を接種実験に供した。その結果、CMV Y 株を接種した際と同様に、接種3日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壊死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壊死斑は観察されなかった。接種5日後の接種葉を図13に示した。更に、接種5日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体

の非接種上葉に壞疽が形成され始めた。その壞疽は徐々に広がり、接種20日後には、ほぼ完全に枯死した。接種14日後における植物体を図14に示した。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは枯死することなく、PVY T 株特有の病徴を呈した。

各形質転換タバコの接種5日後及び接種10日後の非接種上葉より、実施例5で示した方法で全蛋白質を抽出し、PVY T 株の蓄積を検出した。その結果、接種5日後及び接種10日後の非接種上葉いずれの場合も2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコではPVY T 株が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、PVY T 株の蓄積は検出されなかった(図15)。これらのことから、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、接種葉においてPVY T 株感染によって壊死斑を形成し、感染された細胞が壊死するものの、何らかの原因で非接種上葉でもRNaseLが活性化され、全身枯死が引き起こされたと考えられる。しかし、壞疽が出現しはじめた接種5日後と壞疽が進行してきた接種10日後の非接種上葉においてもPVY T 株の蓄積が検出されなかったことは、全身枯死の直接の原因がPVY T 株の過剰蓄積によるものではないことを示している。実際の現場では、ウイルス感染植物は周囲の植物にウイルスを広げる(二次感染)ことを避けるために早期に処分することが行われている。2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコが、PVY T 株感染によってウイルスを蓄積する過程を経ずに枯死することは、2-5Aase+RNaseL (F) 導入植物は、たとえPVY T 株が感染しても二次感染源にはならず、自然に枯死することによって実栽培の際の省力が期待できる。

(実施例9) ポテトウイルス Y 0 株 (PVY 0 株) 感染実験

R1種子(2-5Aase 導入タバコ、1系統(2-5Aase#13b) ; RNaseL (F) 導入タバコ、3系統(RNaseL (F) #23a、RNaseL (F) #27a、RNaseL (F) #30b))、F1種子(2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、3系統(2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b))を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体にPVY 0 株を感染させ病徴を呈したタバコ葉(Samsun株)を、葉の重量あたり10倍量の抽出緩衝液(10mMリン酸緩衝液(pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール)で摩砕し、その粗汁液を鉢上げした後約2週間経過した植物体に接種

し、接種後の経過、病徴の出現を観察した。各形質転換体の系統について5個体を接種実験に供した。その結果、PVY T 株を接種した際とほぼ同様な結果が観察された。つまり、接種3日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壊死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壊死斑は観察されなかった(図16)。更に、接種5日後に2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の非接種上葉に壊疽が形成され始めた。その壊疽は徐々に広がり、接種20日後には、ほぼ完全に枯死した。接種15日後の植物体を図17に示した。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは枯死することなく、PVY O 株特有の病徴を呈した。

各形質転換タバコの接種5日後の接種葉と6日後の非接種上葉より、実施例5で示した方法で全蛋白質を抽出し、感染植物葉中のPVY O 株を検出した。その結果、接種5日後の接種葉と6日後の非接種上葉ともに、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコではPVY O 株が蓄積されている一方、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、PVY O 株の蓄積は検出されなかった(図18)。これらのことから、PVY O 株接種に対しても、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコは、接種葉においてPVY 感染によって壊死斑を形成し、感染された細胞が壊死するものの、ウイルスを蓄積する過程を経ずに枯死することが解かった。このことは、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコがウイルス感染によって枯死する性質は、PVY の株によって相違するものではなく、PVY そのものに対する反応であると考えられる。2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコは、PVY O 株の感染に対してもPVY T 株感染に対するのと同様に栽培の際の省力が期待でき、かつ二次感染源にはならないと考えられる。

(実施例10) 緩衝液

接種F1種子(2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ、3系統(2-5Aase#13b+RNaseL (F) #23a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #27a、2-5Aase#13b+RNaseL (F) #30b))を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体に抽出緩衝液(10mMリン酸緩衝液(pH7.0)、20mM2-メルカプトエタノール)を接種し、接種後の経過、病徴の出現を観察した。各形質転換体の

系統について2個体を接種実験に供した。その結果、接種10日後においても接種葉、非接種葉ともに変化は観察されなかった。

このことは、前記した一連の2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコのウイルス接種後の反応は、まさにウイルスによって引き起こされており、緩衝液成分や接種そのものの行為によって引き起こされたのではないことを示す。

(実施例11) ウシ由来2-5Aase、ウシ由来RNaseL cDNAのクローニングとその塩基配列の決定

ウシ脾臓由来ファージlambda gt10 cDNAライブラリー (Clontech社) より、石田らの方法 (遺伝子発現実験マニュアル第2章、1994年講談社刊) によりファージDNAを抽出してPCRのDNAテンプレートとして用いた。ウシ2-5Aase、RNaseL cDNA断片のPCRクローニングのプライマーは、ヒト2-5Aase cDNA (EMBO J., 4, 2249, 1985)、ヒトRNaseL cDNA (Cell, 72, 753, 1993) の塩基配列を参考にして以下のようにデザインした。

ウシ2-5Aase : 5'-TCCAAGGTGGTAAAGGGTGGCTCCTCAGGCAA-3'

5'-CTCTTGAGCTTGGTGGGGCGCTGCTTCAGGAA-3'

ウシRNaseL : 5'-CTGGGGTTCTATGAGAAGCAAGAAGTAGCTGTGAA-3'

5'-GACAAGTGTAGTTCTTGAACAGCCTTAAATATAGA-3'

石田らの方法によってPCR反応を行い、増幅されたDNA断片をpBluescript SKII⁺ プラスミド (Stratagene社) へサブクローニングした (遺伝子発現実験マニュアル第2章、1994年講談社刊)。これらのPCR増幅DNA断片 (2-5Aase : 455bp、RNaseL : 292bp) の塩基配列を決定し、それらとヒト2-5Aase、RNaseLの塩基配列をそれぞれ比較したところ、相同性 [2-5Aase : 80%、RNaseL : 73% (プライマーの配列部分は計算から除いた)] が認められた。よって、これらのPCR増幅DNA断片はそれぞれ、ウシ由来2-5Aase、RNaseL cDNAの一部であることが確認された。

ここで得られたPCR増幅DNA断片をプローブに用いて、ウシ脾臓由来cDNAファージライブラリーをスクリーニングして2-5Aase、RNaseL cDNA全長をコードするファージクローンを単離した。単離されたファージクローンからDNAを抽出して、cDNAインサートをpBluescript SKII⁺ プラスミドへサ

ブクローニングし、アプライドバイオシステムズ社DNAシーケンサー373Aを使用し、蛍光ダイターミネーター法によりDNA塩基配列を決定し、それから予測されるアミノ酸配列を明らかにした(図19:ウシ2-5Aase cDNA、図20:ウシRNaseL cDNA)。その結果、ウシ2-5Aase は、ヒト2-5AaseE18 (EMBO J., 4, 2249, 1985)、マウス2-5AaseL3 (Virology, 179, 228, 1990) と相同性を持つことがわかった。

ここに得られたウシ2-5Aase、ウシRNaseL cDNAを植物で発現させることによって、ウイルス抵抗性植物の育種が可能となる。

(実施例12) タバコ植物サムソン (Nicotiana tabacum cv Samsun) の形質転換

形質転換には、タバコ植物サムソン (N遺伝子の表現系としてnn) を用いた。実施例2で示した方法、つまりpBI2-5Aase又はpBIRNaseL (F) をそれぞれ導入したアグロバクテリウムLBA4404 によって形質転換体を作出した (2-5Aase (S) タバコ、RNaseL (S) タバコ)。得られた形質転換体を鉢上げし、自家受粉によってR1種子を、また交配によってF1種子 (2-5Aase (S) +RNaseL (S) タバコ) を得た。

(実施例13) 2-5Aase 導入形質転換タバコ (サムソン) 及びRNaseL (F) 導入形質転換タバコ (サムソン) 中の2-5Aase 及びRNaseL活性の検出

2-5Aase 活性の検出は実施例3で示した方法で、また、RNaseL活性の検出は実施例4で示した方法によって行った。その結果を図21及び22に示した。その結果、2-5Aase (S) タバコ中の2-5Aase 活性、及びRNaseL (S) タバコ中のRNaseL活性はともに非形質転換体に比べて有意に高い値を示した。

(実施例14) サムソン形質転換体への、接種源としてウイルス感染植物葉粗汁液を用いたキュウリモザイクウイルス (CMV Y 株) 感染実験

R1種子 (2-5Aase 導入タバコ (2-5Aase (S) #13-10)、RNaseL (F) 導入タバコ (RNaseL (S) #57-6b))、F1種子 (2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコ (2-5Aase (S) #13-10+RNaseL (S) #57-6b)) を用いて、実施例6で示した方法で植物体を育成した。鉢上げした後、約2週間経過した植物体に、実施例7で示した方法でCMV Y 株の感染植物粗汁液を接種し、接種後の経過、病徴の出現を観察した。各形質転換体の系統について3個体を接種実験に供した。その結果、実施例6、7

で示した、キサンチ (N 遺伝子の表現系として NN) 形質転換体に CMV Y 株を接種した際と同様な経過が観察された。つまり、接種 3 日後に、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの、すべての系統、すべての個体の接種葉に壊死斑が観察された。一方、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは壊死斑は観察されなかった (図 23)。更に、感染 10 日後では、2-5Aase 導入タバコ、RNaseL (F) 導入タバコでは、すべての系統、すべての個体で非接種上葉で病徴が観察されたが、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコにおいては、すべての系統、すべての個体の非接種上葉で病徴は観察されなかった (図 24)。このことは、2-5Aase+RNaseL (F) 導入タバコの CMV Y 株に対する抵抗性反応は、宿主に用いたタバコの N 遺伝子の表現系によらないことを示す。

産業上の利用の可能性

2-5Aase/RNaseL システムは、ウイルスが細胞に感染したときに産生される二本鎖 RNA を認識して細胞質でリボヌクレアーゼ活性を発現し、ウイルス増殖を抑制する。一般に RNA ウイルスは、複製の段階で二本鎖 RNA を形成するため、本システムは全ての RNA ウイルスに対して有効である。

よって、本発明で示した遺伝子組換えにより 2-5Aase と RNaseL を導入するウイルス抵抗性植物の作出技術は、ウイルス抵抗性植物品種の育成に広く応用できる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 3 2 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : ヒト

配列

GAGGCAGTTCTGTTGCCACTCTCTCTCCTGTCAATGATGGATCTCAGAAATACCCAGCCAAATCTCTGGAC
AAGTTCATTGAAGACTATCTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCGACCATGCCATTGACATCATC
TGTGGGTTCTGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAGGTGGTAAAGGGT
GGCTCCTCAGGCAAGGGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCTGACCTGGTTGTCTTCTCAGTCCTCTC
ACCACTTTTCAGGATCAGTTAAATCGCCGGGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGT
CAAAGAGAGAGAGCACTTTCCGTGAAGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCGTGGCTCAGC
TTCGTA CTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAGGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTTGCTTTGATGCCCTGGGT
CAGTTGACTGGCAGCTATAAACCTAACCCCAAATCTATGTCAAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAG
AAAGAGGGCGAGTTCACACCTGCTTCACAGAACTACAGAGAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTC
AAGAGCCTCATCCGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAGAAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCTCAG
TATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGAGCATGAAAACACATTTCAACACAGCCCAA
GGATTTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAGCAACTCTGCATCTACTGGACAAAGTATTATGAC
TTTAAAAACCCCATTTATTGAAAAGTACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTGATCCTGGACCCG
GCGGACCCTACAGGAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGCTGAGGCC
TGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCCTGGATTCTGCTGGTGAGACCT
CCTGCTTCTCCCTGCCATTCATCCCTGCCCCTCTCCATGAAGCTTGAGACATATAGCTGGAGACCATTCTT
TCCAAAGAACTTACCTCTTGCCAAAGGCCATTATATTCATATAGTGACAGGCTGTGCTCCATATTTTACAG
TCATTTTGGTCACAATCGAGGGTTTCTGGAATTTTCACATCCCTTGTCAGAAATTCATTCCCCTAAGAGTAA
TAATAATAATCTCTAACACCAAAAA

配列番号 : 2

配列の長さ : 50

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TTATTGAAAA GTACCTGAGA AGGCAGCTCA CGAAACCCAG GCCTGTGATC 50

配列番号 : 3

配列の長さ : 2378

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : ヒト

配列

CTTTGATTAAAGTGCTAGGAGATAAATTTGCATTTTCTCAAGGAAAAGGCTAAAAGTGGTAGCAGGTGGCATT
TACCGTCATGGAGAGCAGGGATCATAACAACCCCCAGGAGGGACCCACGTCCTCCAGCGGTAGAAGGGCTGC
AGTGGAAGACAATCACTTGCTGATTAAAGCTGTTCAAAACGAAGATGTTGACCTGGTCCAGCAATTGCTGGA
AGGTGGAGCCAATGTTAATTTCCAGGAAGAGGAAGGGGGCTGGACACCTCTGCATAACGCAGTACAAATGAG
CAGGGAGGACATTGTGGAACCTTCTGCTTCGTCATGGTGCTGACCCTGTTCTGAGGAAGAAGAATGGGGCCAC
GCCTTTTATCCTCGCAGCGATTGCGGGGAGCGTGAAGCTGCTGAAACTTTTCTTTCTAAAGGAGCAGATGT
CAATGAGTGTGATTTTTATGGCTTCACAGCCTTCATGGAAGCCGCTGTGTATGGTAAGGTCAAAGCCCTAAA
ATTCCTTTATAAGAGAGGAGCAAATGTGAATTTGAGGCGAAAGACAAAGGAGGATCAAGAGCGGCTGAGGAA
AGGAGGGGGCCACAGCTCTCATGGACGCTGCTGAAAAAGGACACGTAGAGGTCTTGAAGATTCTCCTTGATGA
GATGGGGGCAGATGTAAACGCCTGTGACAATATGGGCAGAAATGCCTTGATCCATGCTCTCCTGAGCTCTGA
CGATAGTGATGTGGAGGCTATTACGCATCTGCTGCTGGACCATGGGGCTGATGTCAATGTGAGGGGAGAAAG
AGGGAAGACTCCCCTGATCCTGGCAGTGGAGAAGAAGCACTTGGGTTTGGTGCAGAGGCTTCTGGAGCAAGA

GCACATAGAGATTAATGACACAGACAGTGATGGCAAAACAGCACTGCTGCTTGCTGTTGAACTCAAACCTGAA
GAAAATCGCCGAGTTGCTGTGCAAACGTGGAGCCAGTACAGATTGTGGGGATCTTGTTATGACAGCGAGGGC
GAATTATGACCATTCCCTTGTGAAGGTTCTTCTCTCATGGAGCCAAAGAAGATTTTCACCCTCCTGCTGA
AGACTGGAAGCCTCAGAGCTCACACTGGGGGGCAGCCCTGAAGGATCTCCACAGAATATACCGCCCTATGAT
TGGCAAACTCAAGTTCTTTATTGATGAAAAATACAAAATTGCTGATACTTCAGAAGGAGGCATCTACCTGGG
GTTCTATGAGAAGCAAGAAGTAGCTGTGAAGACGTTCTGTGAGGGCAGCCACGTGCACAGCGGGAAGTCTC
TTGTCTGCAAAGCAGCCGAGAGAACAGTCACTTGGTGACATTCTATGGGAGTGAGAGCCACAGGGGCCACTT
GTTTGTGTGTGCACCCTCTGTGAGCAGACTCTGGAAGCGTGTGGATGTGCACAGAGGGGAAGATGTGGA
AAATGAGGAAGATGAATTTGCCGAAATGTCCTGTCATCTATATTTAAGGCTGTTCAAGAACTACACTTGTC
CTGTGGATACACCCACCAGGATCTGCAACCACAAAACATCTTAATAGATTCTAAGAAAGCTGCTCACCTGGC
AGATTTTGATAAGAGCATCAAGTGGGCTGGAGATCCACAGGAAGTCAAGAGAGATCTAGAGGACCTTGGACG
GCTGGTCCTCTATGTGGTAAAGAAGGGAAGCATCTCATTTGAGGATCTGAAAGCTCAAAGTAATGAAGAGGT
GGTTCAACTTTCTCCAGATGAGGAACTAAGGACCTCATTTCATCGTCTCTTCCATCCTGGGGAACATGTGAG
GGACTGTCTGAGTGACCTGCTGGGTCTCCCTTCTTTTGGACTTGGGAGAGCCGCTATAGGACGCTTCGGAA
TGTGGGAAATGAATCCGACATCAAAACACGAAAATCTGAAAGTGAGATCCTCAGACTACTGCAACCTGGGCC
TTCTGAACATTCCAAAAGTTTTGACAAGTGGACGACTAAGATTAATGAATGTGTTATGAAAAAATGAATAA
GTTTTATGAAAAAGAGGCAATTTCTACCAGAACACTGTGGGTGATCTGCTAAAGTTCATCCGGAATTTGGG
AGAACACATTGATGAAGAAAAGCATAAAAAGATGAAATTAATAATTGGAGACCCTTCCCTGTATTTTCAGAA
GACATTTCCAGATCTGGTGATCTATGTCTACAAAACTACAGAACACAGAATATAGAAAGCATTTCCCCCA
AACCCACAGTCCAAACAAACCTCAGTGTGATGGAGCTGGTGGGGCCAGTGGGTTGGCCAGCCCTGGGTGCTG
ATGGACTGATTTGCTGGAGTTCAGGGAACTACTTATTAGCTGTAGAGTCCTTGGCAAATCACAACATTCTGG
GC

配列番号 : 4

配列の長さ : 51

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

AATGGGGCCA CGCTTTTAT CCTCGCAGCG ATTGCGGGGA GCGTGAAGCT G 51

配列番号 : 5

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TCCAAGGTGG TAAAGGTGG CTCCTCAGGC AA

配列番号 : 6

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTCTTGAGCT TGGTGGGGCG CTGCTTCAGG AA

配列番号 : 7

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CTGGGGTTCT ATGAGAAGCA AGAAGTAGCT GTGAA

配列番号 : 8

配列の長さ : 35

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACAAGTGTA GTTCTTGAAC AGCCTTAAAT ATAGA

配列番号：9

配列の長さ：1170

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ウシ

配列

5'	ATG	GAA	CTC	AGA	TAT	ACC	COG	GCC	GGG	TCT	CTA	GAC	AAG	TTC	ATC	CAA	GTC	CAC
	M	E	L	R	Y	T	P	A	G	S	L	D	K	F	I	Q	V	H
	CTC	CTG	CCA	AAC	GAA	GAA	TTC	AGC	ACG	CAG	GTC	CAA	GAA	GCC	ATC	GAC	ATC	ATC
	L	L	P	N	E	E	F	S	T	Q	V	Q	E	A	I	D	I	I
	TGC	ACT	TTC	CTG	AAG	GAA	AAG	TGT	TTC	CGA	TGT	GCC	CCT	CAC	AGA	GTT	CGG	GTG
	C	T	F	L	K	E	K	C	F	R	C	A	P	H	R	V	R	V
	TCC	AAA	GTT	GTG	AAG	GGC	GGC	TCC	TCA	GGC	AAA	GGC	ACG	ACC	CTC	AGG	GGA	CGA
	S	K	V	V	K	G	G	S	S	G	K	G	T	T	L	R	G	R
	TCA	GAT	GCT	GAC	CTC	GTC	GTC	TTC	CTC	ACC	AAT	CTC	ACA	AGT	TTT	CAG	GAA	CAG
	S	D	A	D	L	V	V	F	L	T	N	L	T	S	F	Q	E	Q
	CTT	GAG	CGC	CGA	GGA	GAA	TTC	ATT	GAA	GAA	ATC	AGG	AGA	CAG	CTG	GAA	GCC	TGT
	L	E	R	R	G	E	F	I	E	E	I	R	R	Q	L	E	A	C
	CAA	AGA	GAG	GAA	ACA	TTT	GAA	GTG	AAG	TTT	GAG	GTC	CAG	AAA	CGG	CAA	TGG	GAG
	Q	R	E	E	T	F	E	V	K	F	E	V	Q	K	R	Q	W	E

AAT	CCC	387	CGC	GCT	CTC	396	AGC	TTT	GTG	405	CTG	AGG	TCC	414	CCC	AAG	CTC	423	AAC	CAG	GCG	432	GTG
N	P	R	A	L	S	F	V	L	R	S	P	K	L	N	Q	A	V						
GAG	TTC	441	TAT	GTC	CTG	450	CCC	GCC	TTT	459	GAT	GCC	CTA	468	GGT	CAG	TTG	477	ACC	AAA	GGT	486	TAC
E	F	Y	V	L	P	A	F	D	A	L	G	Q	L	T	K	G	Y						
AGA	CCT	495	GAC	TCT	AGA	504	GTC	TAT	GTC	513	CGG	CTC	ATC	522	CAA	GAG	TGC	531	GAG	AAC	CTG	540	AGG
R	P	D	S	R	V	Y	V	R	L	I	Q	E	C	E	N	L	R						
AGA	GAG	549	GGC	GAG	TTC	558	TCC	CCC	TGC	567	TTC	ACG	GAG	576	CTG	CAG	CGA	585	GAC	TTC	CTG	594	AAG
R	E	G	E	F	S	P	C	F	T	E	L	Q	R	D	F	L	K						
AAT	CGT	603	CCA	ACC	AAG	612	CTG	AAG	AAC	621	CTC	ATC	CGC	630	CTG	GTG	AAG	639	CAC	TGG	TAC	648	CAA
N	R	P	T	K	L	K	N	L	I	R	L	V	K	H	W	Y	Q						
CTG	TGT	657	AAG	GAG	CAG	666	CTT	GGA	AAG	675	CCA	TTG	CCC	684	CCA	CAA	TAT	693	GCT	CTG	GAG	702	CTT
L	C	K	E	Q	L	G	K	P	L	P	P	Q	Y	A	L	E	L						
CTG	ACG	711	GTC	TAT	GCC	720	TGG	GAA	CAA	729	GGA	TGC	AAT	738	AAA	ACA	GGA	747	TTC	ATC	ACA	756	GCT
L	T	V	Y	A	W	E	Q	G	C	N	K	T	G	F	I	T	A						
CAG	GGA	765	TTT	CAG	ACT	774	GTC	TTG	AAA	783	TTA	GTC	CTA	792	AAG	TAT	CAG	801	AAG	CTT	TGC	810	ATC
Q	G	F	Q	T	V	L	K	L	V	L	K	Y	Q	K	L	C	I						
TAC	TGG	819	GAA	AAG	AAC	828	TAT	AAC	TCT	837	GAA	AAC	CCT	846	ATT	ATT	GAA	855	GAA	TAT	CTG	864	ACG
Y	W	E	K	N	Y	N	S	E	N	P	I	I	E	E	Y	L	T						
AAG	CAA	873	CTT	GCA	AAA	882	CCC	AGG	CCT	891	GTG	ATT	CTG	900	GAC	CCG	GCG	909	GAC	CCT	ACA	918	GGA
K	Q	L	A	K	P	R	P	V	I	L	D	P	A	D	P	T	G						
AAT	GTT	927	GCT	GGT	AAA	936	GAC	GCA	TAT	945	AGC	TGG	GAA	954	CGG	CTT	GCA	963	CGA	ACG	GCT	972	TTG
N	V	A	G	K	D	A	Y	S	W	E	R	L	A	R	T	A	L						
GTC	TGG	981	CTG	GAT	TAC	990	CCG	TGC	TTT	999	AAG	AAA	TGG	1008	GAT	GGG	TCT	1017	CCC	GTG	GGC	1026	TCC
V	W	L	D	Y	P	C	F	K	K	W	D	G	S	P	V	G	S						
TGG	GAT	1035	GTG	TCG	CCC	1044	CAA	GAA	CAC	1053	AGT	GAC	CTG	1062	ATG	TTC	CAG	1071	GCC	TAT	GAT	1080	TTT
W	D	V	S	P	Q	E	H	S	D	L	M	F	Q	A	Y	D	F						

1089	1098	1107	1116	1125	1134
AGA CAG CAC TAT	AGA CCC TCT	CCA GGA ATC	CAG TTC CAC	GGA GGA GCC	TCT CCC
---	---	---	---	---	---
R Q H Y	R P S	P G I	Q F H	G G A	S P
1143	1152	1161	1170		
CAG GTG GAA GAG AAC TGG	ACA TGT ACC	ATC CTC TGA	3'		
---	---	---	---		
Q V E E	N W T	C T I	L *		

配列番号 : 10

配列の長さ : 2157

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : ウシ

配列

5'	ATG	GAG	ACT	GAG	AGC	CAT	AAC	AAC	CCT	CAG	GAA	AGA	CCC	ACA	CCC	TCT	AGT	AAT	54
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	M	E	T	E	S	H	N	N	P	Q	E	R	P	T	P	S	S	N	
	GGG	AAG	GCT	TCA	ATG	GGA	GAC	AAT	CAT	TCG	TTG	ATT	AAA	GCT	GTT	AGA	GAT	GAA	108
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	K	A	S	M	G	D	N	H	S	L	I	K	A	V	R	D	E	
	GAC	ATT	GAG	TCG	GTC	CAG	CAA	TTG	CTA	GAA	AGA	GGG	GCT	GAT	GTC	AAT	TTC	CAG	162
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	D	I	E	S	V	Q	Q	L	L	E	R	G	A	D	V	N	F	Q	
	GAA	GAA	TGG	GGC	TGG	TCA	CCT	TTG	CAT	AAT	GCA	GTA	CAA	GTT	GAC	AGA	GAG	GAC	216
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	E	E	W	G	W	S	P	L	H	N	A	V	Q	V	D	R	E	D	
	ATT	GTG	GAA	CTT	CTG	CTT	AGT	CAT	GGT	GCT	GAG	CCT	TGT	CTG	CGG	AAG	AAG	AAT	270
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	I	V	E	L	L	L	S	H	G	A	E	P	C	L	R	K	K	N	
	GGG	CCC	ACT	CCC	TTC	ATC	ATT	GCT	GGG	ATT	GTG	GGA	AAC	GTG	AAG	TTG	CTC	AAA	324
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	G	A	T	P	F	I	I	A	G	I	V	G	N	V	K	L	L	K	

CTA	TTA	333 CTT	CCT	AAA	342 GTA	ACA	GAT	351 GTC	AAT	GAG	360 TGT	GAT	GTT	369 AAT	GGC	TTC	378 ACA
L	L	L	P	K	V	T	D	V	N	E	C	D	V	N	G	F	T
GCT	TTC	387 ATG	GAA	GCT	396 GCT	GTG	TAT	405 GGC	AAA	GTC	414 GAA	GCC	TTA	423 AGA	TTC	CTG	432 TAT
A	F	M	E	A	A	V	Y	G	K	V	E	A	L	R	F	L	Y
AAC	AAC	441 GGA	GCA	GAG	450 GTG	AAT	TTG	459 CAC	AGA	AAG	468 ACA	ATA	GAG	477 GAT	CAA	GAG	486 AGG
N	N	G	A	E	V	N	L	H	R	K	T	I	E	D	Q	E	R
GTT	AAG	495 AAA	GGA	GGG	504 GCC	ACT	GCT	513 CTC	ATG	GAT	522 GCT	GCT	AGA	531 AGA	GGG	CAT	540 GTA
V	K	K	G	G	A	T	A	L	M	D	A	A	R	R	G	H	V
GAT	GTC	549 GTA	GAG	ATC	558 CTC	CTT	CAT	567 GAG	ATG	GGG	576 GCA	GAT	GTC	585 AAT	GCT	CGG	594 GAC
D	V	V	E	I	L	L	H	E	M	G	A	D	V	N	A	R	D
AAT	AGG	603 GGC	AGA	AAT	612 GCT	TTA	ATC	621 TAT	GCT	CTT	630 CTG	AAC	TCT	639 GAT	GAT	GAG	648 AAG
N	R	G	R	N	A	L	I	Y	A	L	L	N	S	D	D	E	K
GTG	AAA	657 GTG	AAA	GCN	666 ACT	ACT	CGC	675 CTT	CTG	CTG	684 GAC	TAT	AAG	693 GTT	GAT	GTC	702 AAT
V	K	V	K	A	T	T	R	L	L	L	D	Y	K	V	D	V	N
GTG	AGG	711 GGG	GAA	GGA	720 AGG	AAG	ACG	729 CCG	CTG	ATC	738 TTG	GCA	GTG	747 GAA	AAG	AAG	756 AAC
V	R	G	E	G	R	K	T	P	L	I	L	A	V	E	K	K	N
CTG	GAT	765 CTG	GTG	CAG	774 ATG	CTT	CTG	783 GAA	CAA	ACA	792 GCT	ATA	GAG	801 ATT	AAT	GAC	810 ACA
L	D	L	V	Q	M	L	L	E	Q	T	A	I	E	I	N	D	T
GAC	AGT	819 GAG	GGT	AAA	828 ACA	GCA	CTG	837 CTG	CTT	GCT	846 GTC	GAG	CTC	855 AAG	CTG	AAG	864 GAA
D	S	E	G	K	T	A	L	L	L	A	V	E	L	K	L	K	E
ATT	GCC	873 CAG	TTG	CTG	882 TGT	CGC	AAA	891 GGA	GCC	AGC	900 ACA	AAA	TGC	909 GGG	GAC	CTC	918 GTC
I	A	Q	L	L	C	R	K	G	A	S	T	K	C	G	D	L	V
GCA	ATA	927 GCG	AAG	CGC	936 AAT	TAT	GAC	945 TCT	GAC	CTT	954 GCA	AAG	TTT	963 CTT	CGC	CAG	972 CAT
A	I	A	K	R	N	Y	D	S	D	L	A	K	F	L	R	Q	H
GGA	GCT	981 GTA	GAA	GAC	990 GTT	TGC	CCT	999 CCT	GCT	AAA	1008 GCC	TGG	AAG	1017 CCT	CAG	AGC	1026 TCA
G	A	V	E	D	V	C	P	P	A	K	A	W	K	P	Q	S	S

1035	1044	1053	1062	1071	1080
CGT TGG GGG GAG GCC CTG AAA CAT CTT CAC AGG ATA TAC CGC CCT ATG ATA GGC					
R W G E A L K H L H R I Y R P M I G					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
AAA CTC AAG ATC TTT ATT GAT GAA GAA TAT AAA ATC GCT GAC ACT TCC CAA GGC					
K L K I F I D E E Y K I A D T S Q G					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
GGC ATC TAC CTG GGG TTA TAT GAG GAA CAA GAG GTA GCT GTG AAG CGG TTC CCT					
G I Y L G L Y E E Q E V A V K R F P					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
AAA GGC AGC ACA CGG GGA CAA AAT GAA GTC TCT TGT TTG CAG AGC AAC CGA GCC					
K G S T R G Q N E V S C L Q S N R A					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
AAT GGT CAC GTG GTG ACG TTC TAT GGC AGT GAG AGC GAC AGG ACC TGT CTG TAT					
N G H V V T F Y G S E S D R T C L Y					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
GTG TGC CTT GCC CTG TGT GAG CAC ACG CTG GAG AAG CAC TTG GAC GAC CGC AAA					
V C L A L C E H T L E K H L D D R K					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
GGA GAG GCT GTG CAA AAC AAG GAA GAT GAA TTT GCC CGC AAC ATC CTC TCA TCT					
G E A V Q N K E D E F A R N I L S S					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
CTG TTT AAG GCT GTT GAG GAA CTA CAC CGG TCT GGA TAC ACT CAT CAG GAT CTG					
L F K A V E E L H R S G Y T H Q D L					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
CAA CCG CAG AAC ATC TTA ATA GAT TCC AAG AAT GGT GCT TGC CTG GCA GAT TTT					
Q P Q N I L I D S K N G A C L A D F					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
GAT AAA AGC GTC AAG GGG ACT GGA GAT CCA CAG GAA ATC AAG AGA GAT CTA GAG					
D K S V K G T G D P Q E I K R D L E					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
GCC CTG GGA CTG CTG GTC CTA TAT GTG GTA AAA AAG GGA AAT GAT TCT TTT GAG					
A L G L L V L Y V V K K G N D S F E					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
ATG CTG AAG AAT CTA AGA ACT GAA GAG TTG ATT GAG CGT TCT CCA GAT AAG GAA					
M L K N L R T E E L I E R S P D K E					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACT CGG GAC CTC ATT CGG CAT CTG TTA GTC CCT GGG GAC AAT GTG AAG GGC CAT					
T R D L I R H L L V P G D N V K G H					

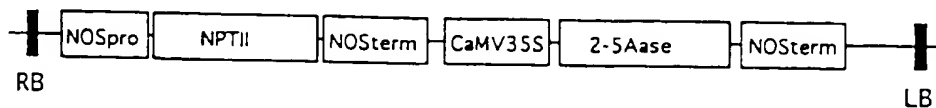
1737	1746	1755	1764	1773	1782
CTG AGT GGC	CTG GCT	CAT CCC TTC	TGG AGT TGG	GAG AGC	CGC TAC CGG
L S G	L L A	H P F	F W S	W E S	R Y R
1791	1800	1809	1818	1827	1836
ACC CTA CGG	GAT GTG GGA	AAC GAA TCT	GAC ATC AAA	ACA CGA AAT	ACT AAT GGC
T L R	D V G	N E S	D I K	T R N	T N G
1845	1854	1863	1872	1881	1890
AAG ATC CTC	CAG CTT CTG	CAA CCT GAA	ACA TCT GAA	CTT CCA AGT	TTT GCC CAG
K I L	Q L L	Q P E	T S E	L P S	F A Q
1899	1908	1917	1926	1935	1944
TGG ACA ATT	GAG GTT GAC	AAA TCT GTG	ATG AAA AAA	ATG AAT ACC	TAT CAG AAC
W T I	E V D	K S V	M K K	M N T	Y Q N
1953	1962	1971	1980	1989	1998
ACT GTA GGT	GAC CTG CTG	AAG TTC ATC	CGG AAT GTG	GGA GAG CAC	ATT AAT GAA
T V G	D L L	K F I	R N V	G E H	I N E
2007	2016	2025	2034	2043	2052
CAA AAG AAT	ATA GAG ATG	AAG TCA AAA	ATT GGA GAA	CCT TCC CAG	TAT TTT CAG
Q K N	I E M	K S K	I G E	P S Q	Y F Q
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GAG AAA TTT	CCA GAT CTG	GTC ATG TAT	GTC TAT AAA	AGA CTA CAG	AAC ACA GAA
E K F	P D L	V M Y	V Y K	R L Q	N T E
2115	2124	2133	2142	2151	
TAT GCA AAG	CAT TTT CCA	AAA AAT CTC	AAC CTG AAC	AAA CCC GAC	GTG TGA 3'
Y A K	H F P	K N L	N L N	K P D	V *

請 求 の 範 囲

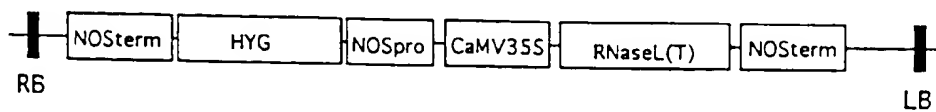
1. 動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んで発現させることにより、RNAウイルスに抵抗性を持つ植物を作出する方法。
2. 動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来である請求の範囲第1項記載の方法。
3. 動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来のcDNAである請求の範囲第2項記載の方法。
4. 動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来である請求の範囲第1項記載の方法。
5. 動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来のcDNAである請求の範囲第4項記載の方法。
6. 動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来であり、かつ動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来である請求の範囲第1項記載の方法。
7. 動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列がヒト、マウス、ラット又はウシのいずれか由来のcDNAであり、かつ動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列がヒト又はウシ由来のcDNAである請求の範囲第6項記載の方法。
8. 請求の範囲第1項記載の方法によって作出された植物。
9. 動物細胞由来2',5' オリゴアデニル酸合成酵素をコードするDNA配列及び動物細胞由来リボヌクレアーゼLをコードするDNA配列を植物染色体中に組み込んだ植物。

FIG. 1

pBI2-5Aase



pBIBRNaseL(T)



pBIBRNaseL(F)

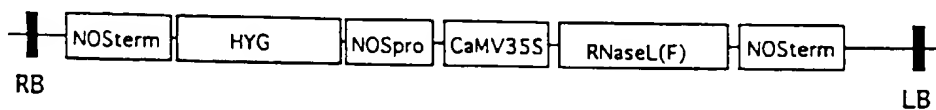


FIG. 2

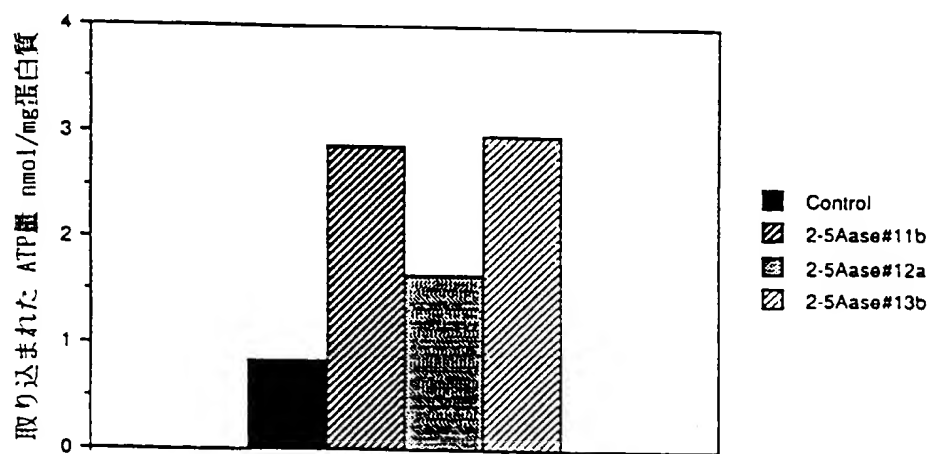


FIG. 3

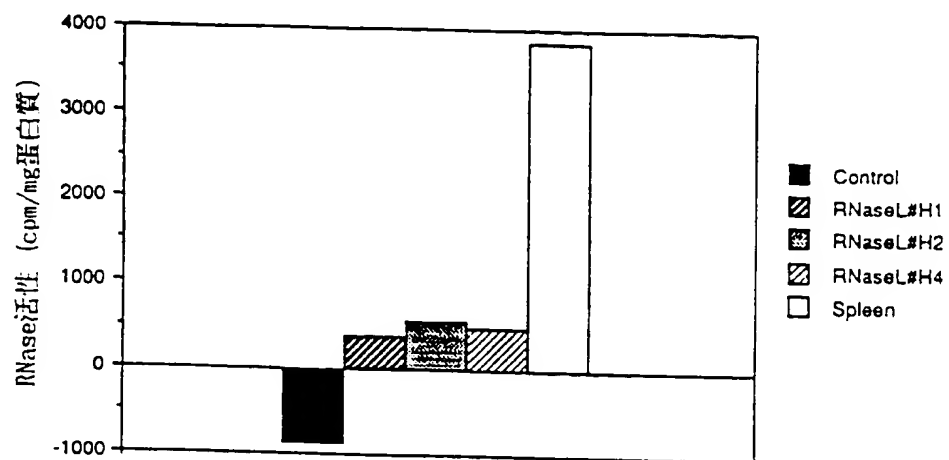


FIG. 4

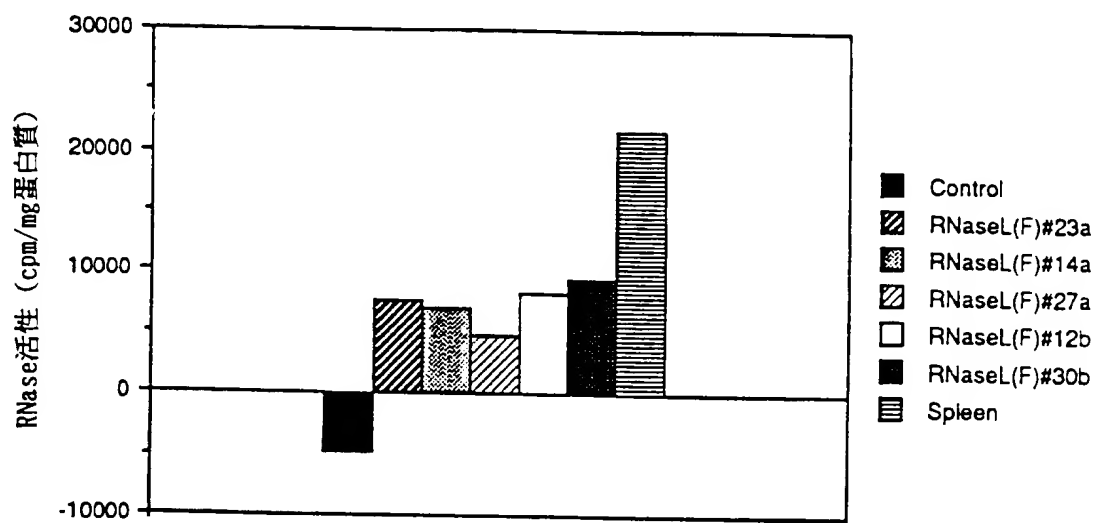


FIG. 5

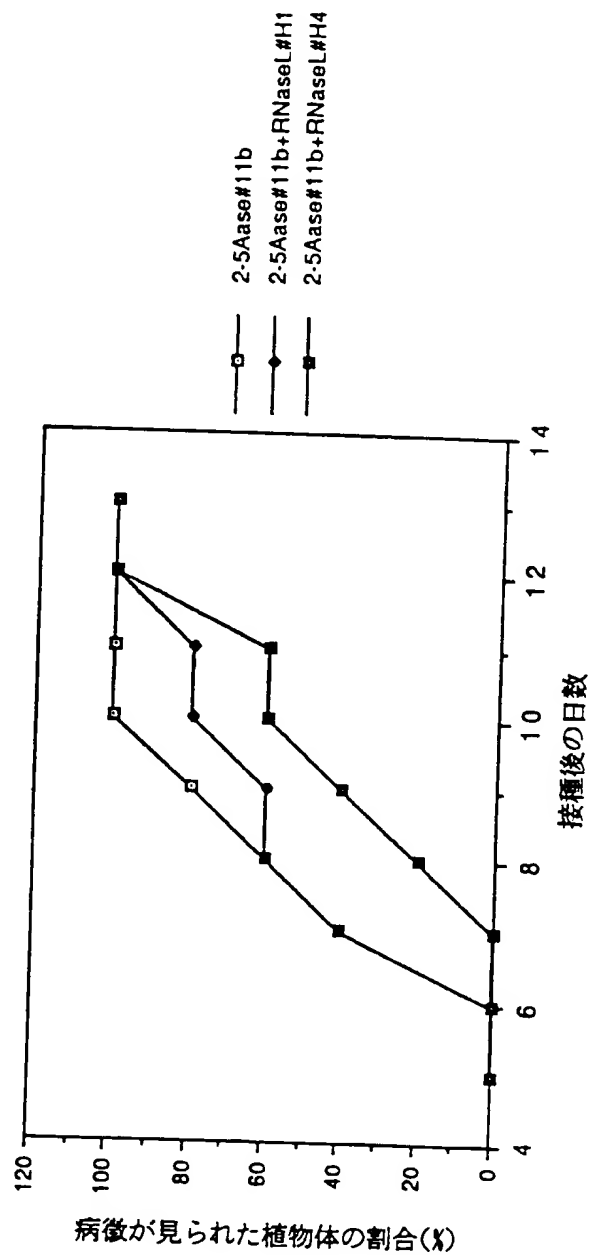


FIG. 6

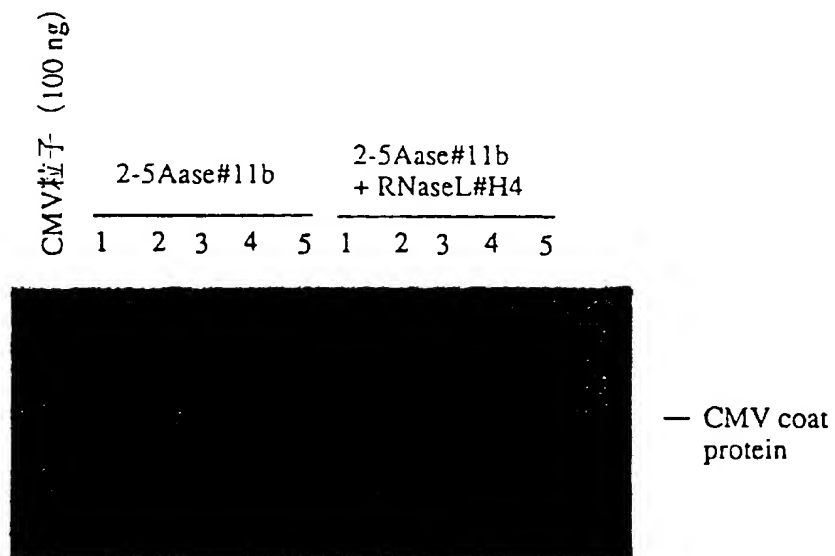


FIG. 7A

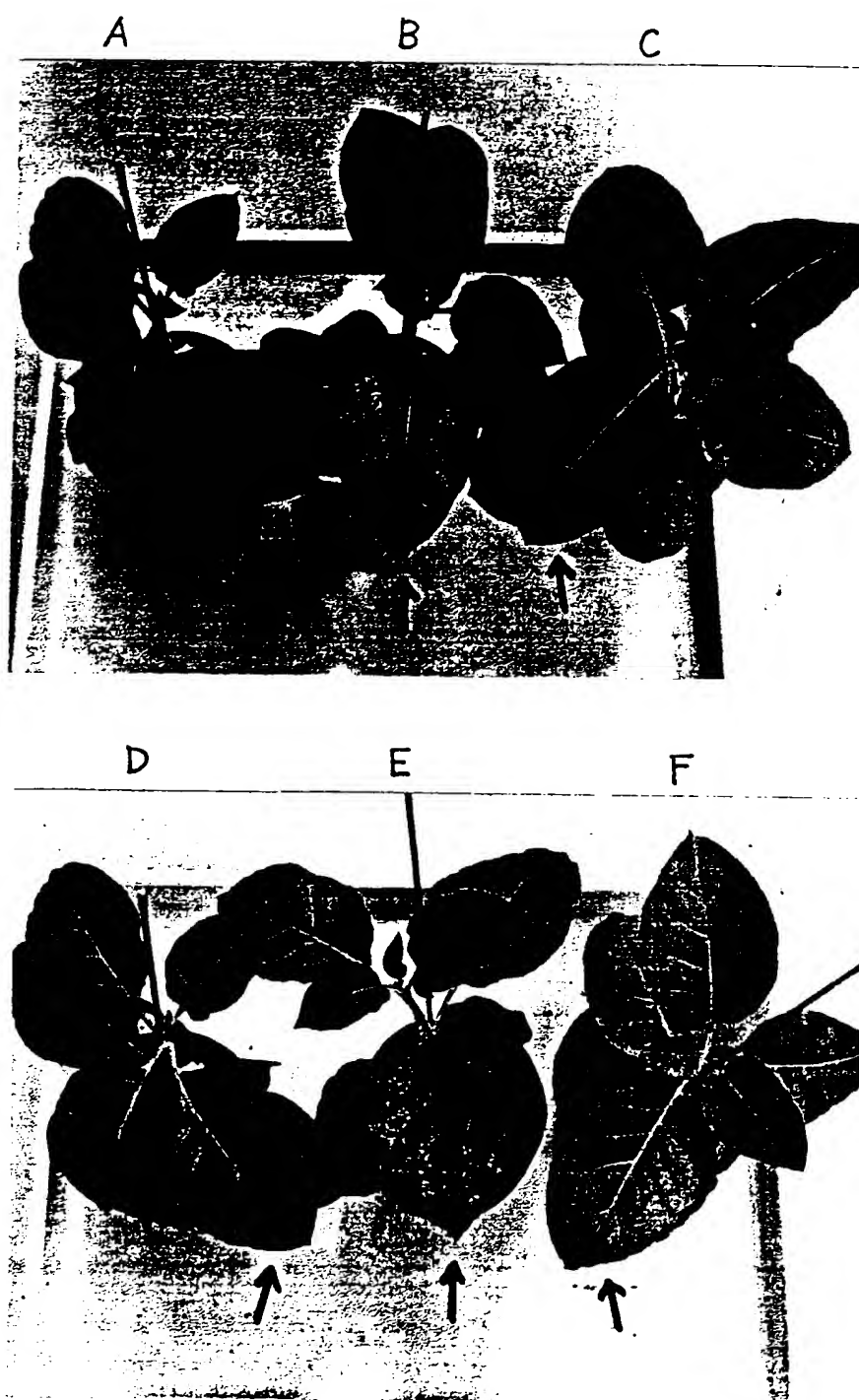


FIG. 7B

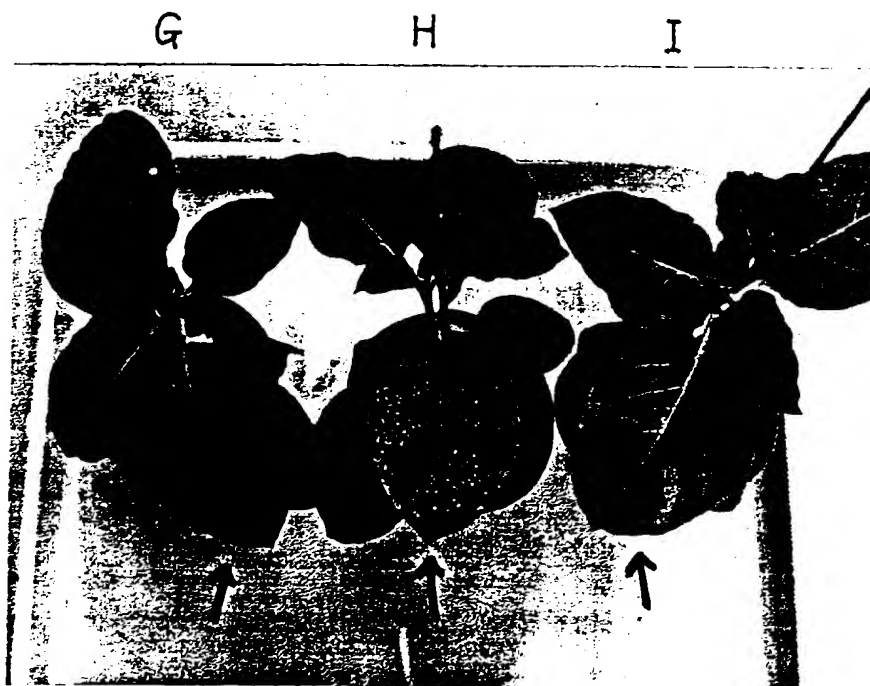


FIG. 8A

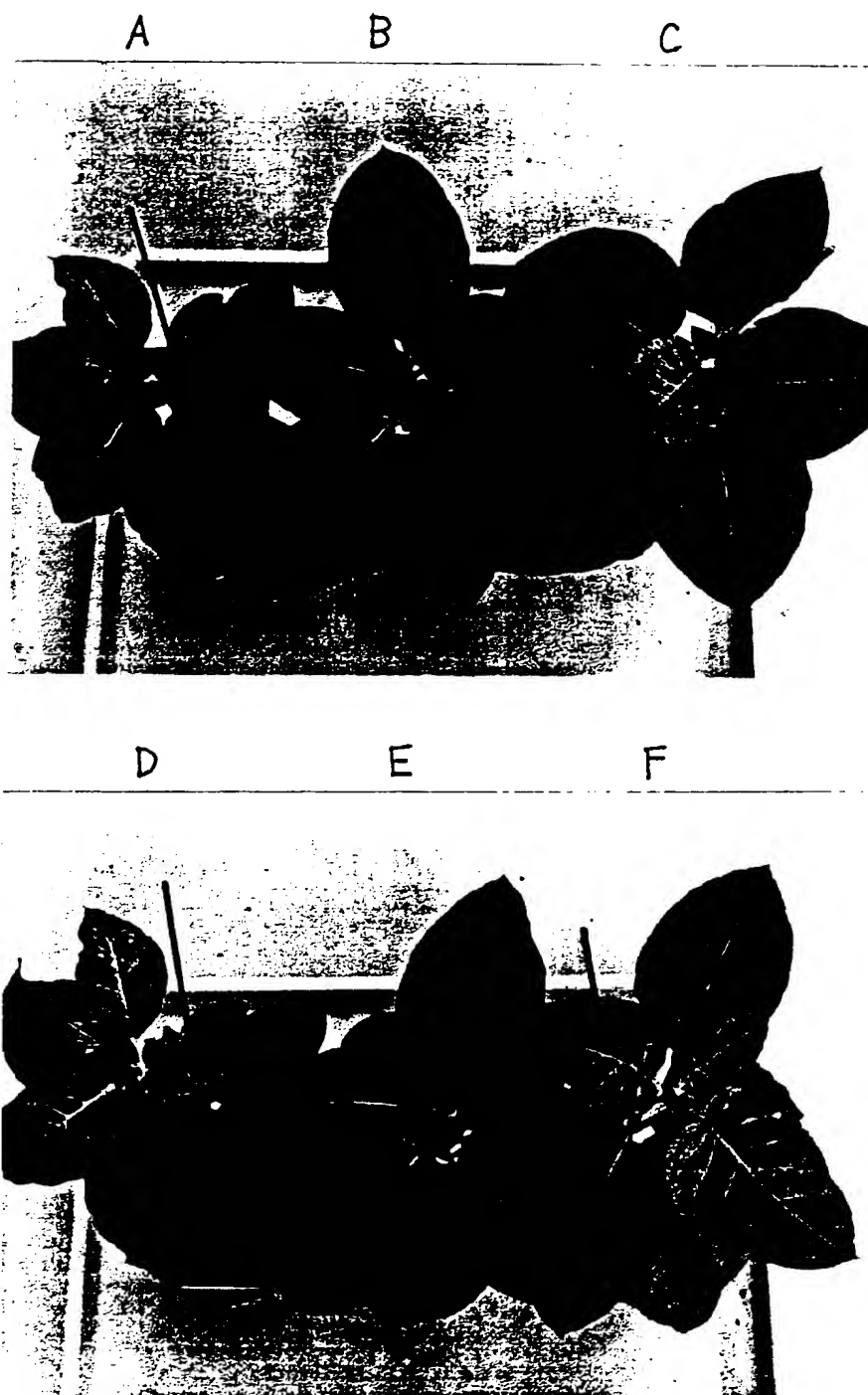


FIG. 8B



FIG. 9

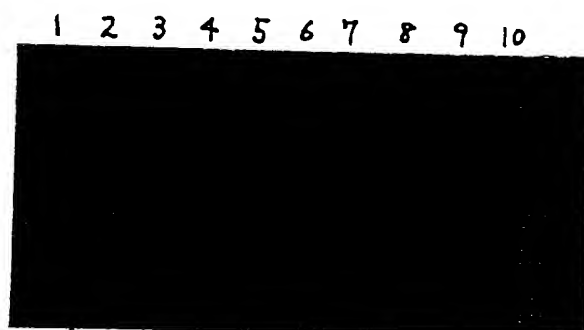


FIG. 10

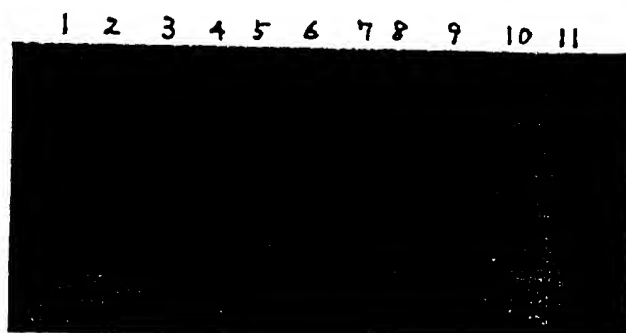


FIG. 11



FIG. 12

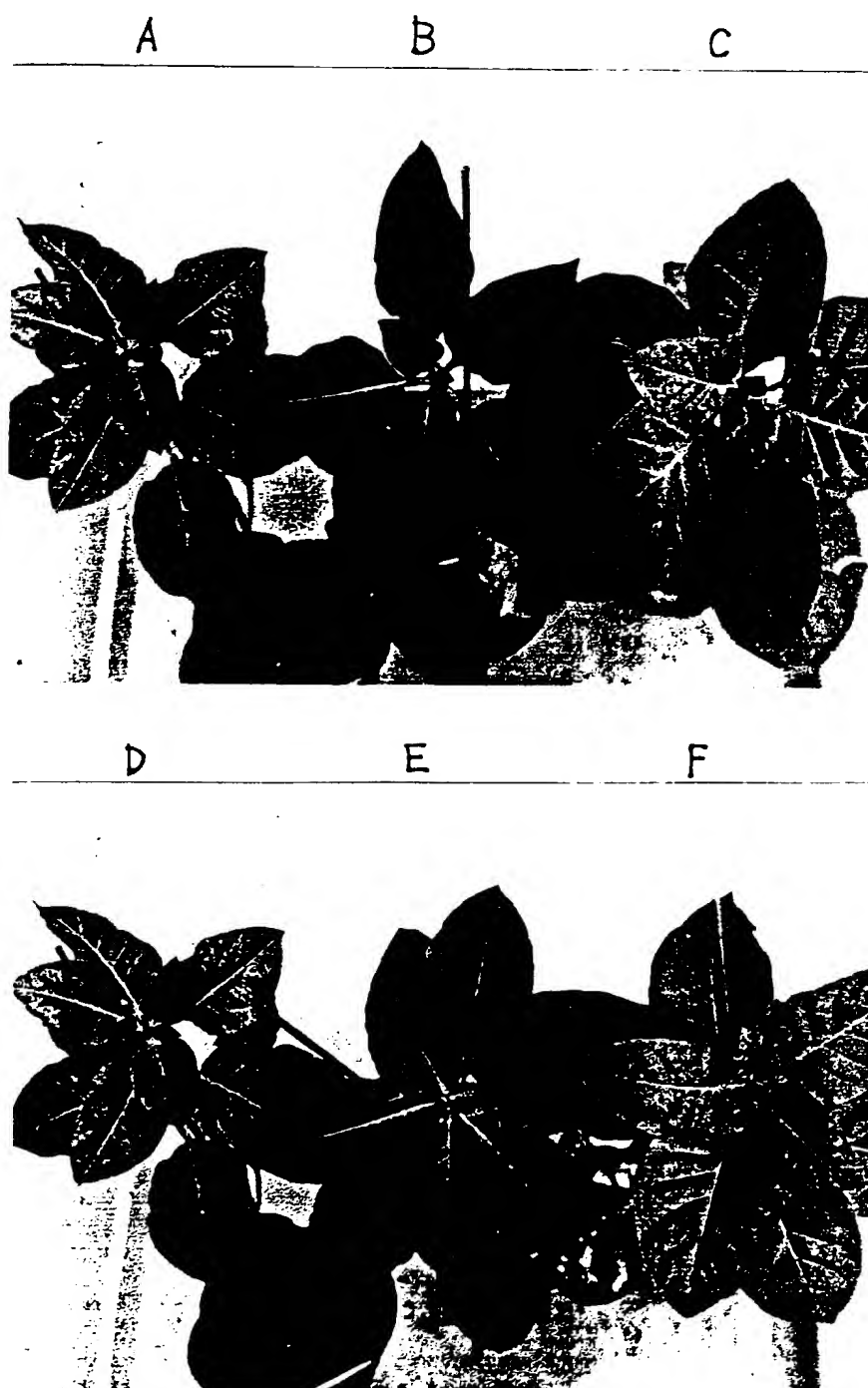


FIG. 13

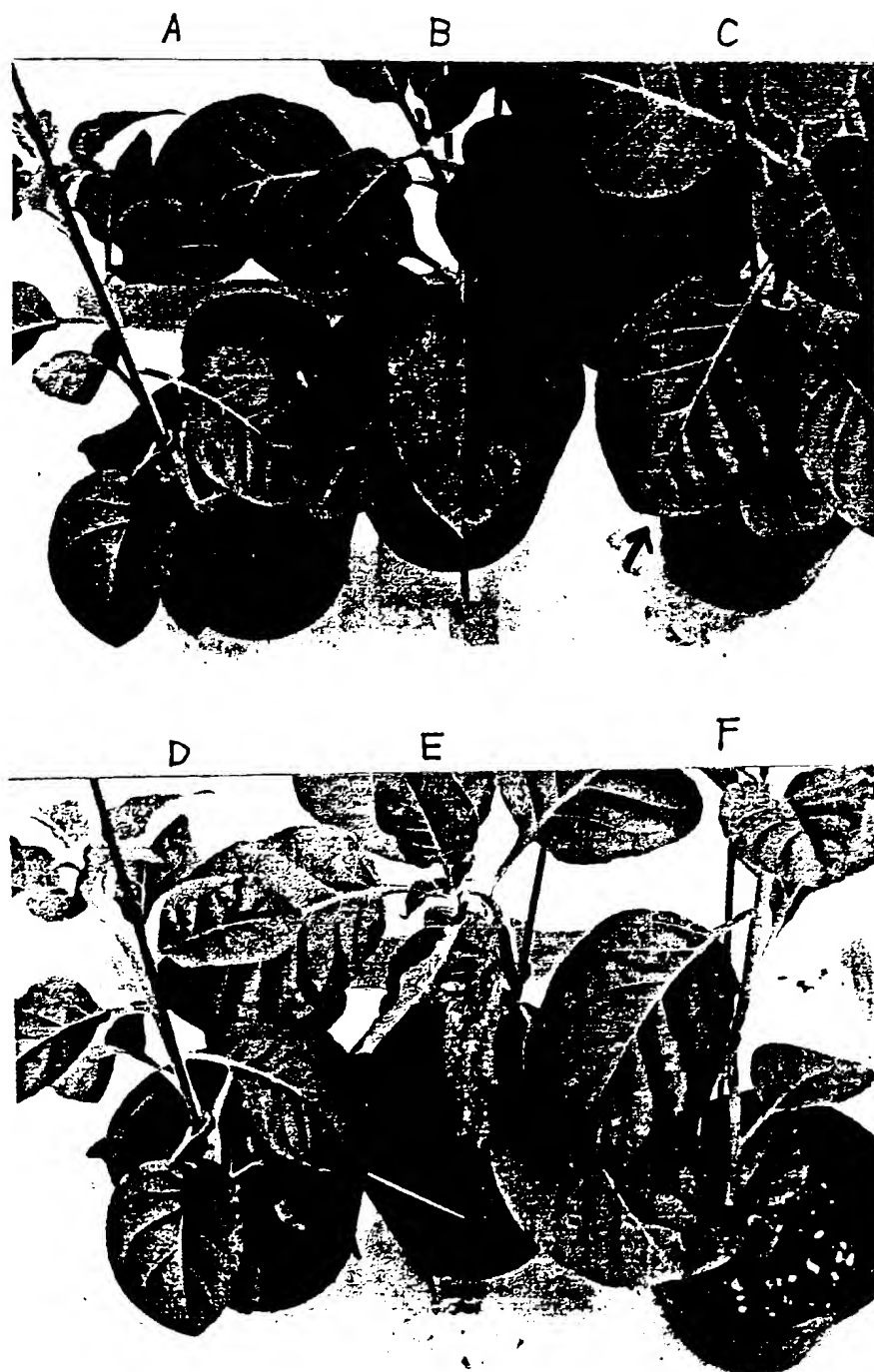


FIG. 14A

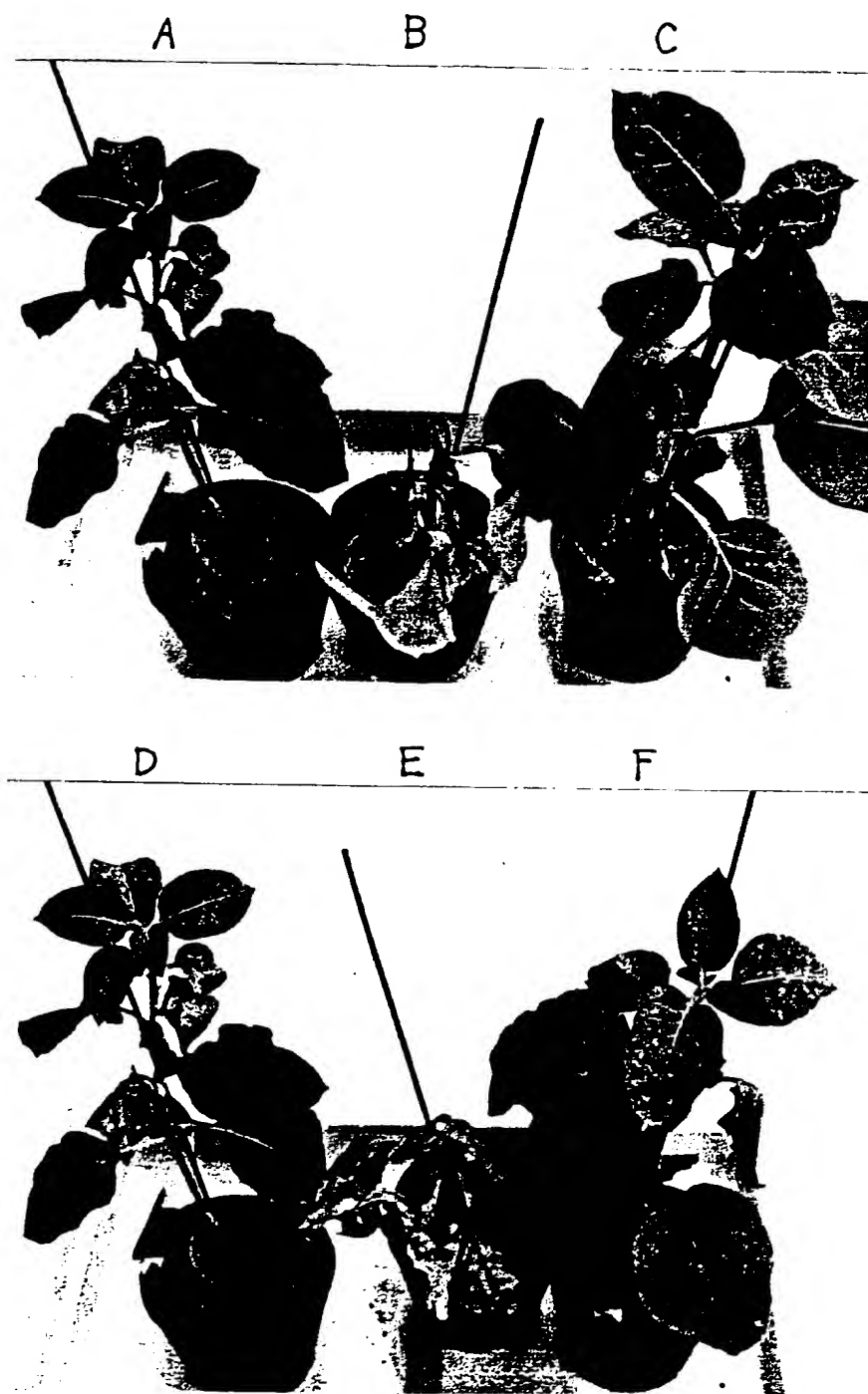


FIG. 14B

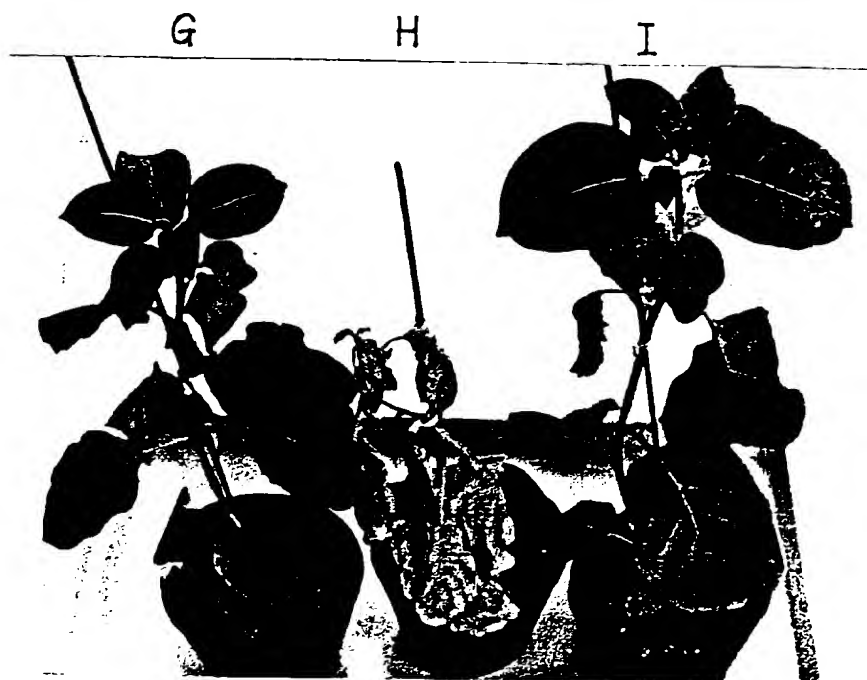


FIG. 15

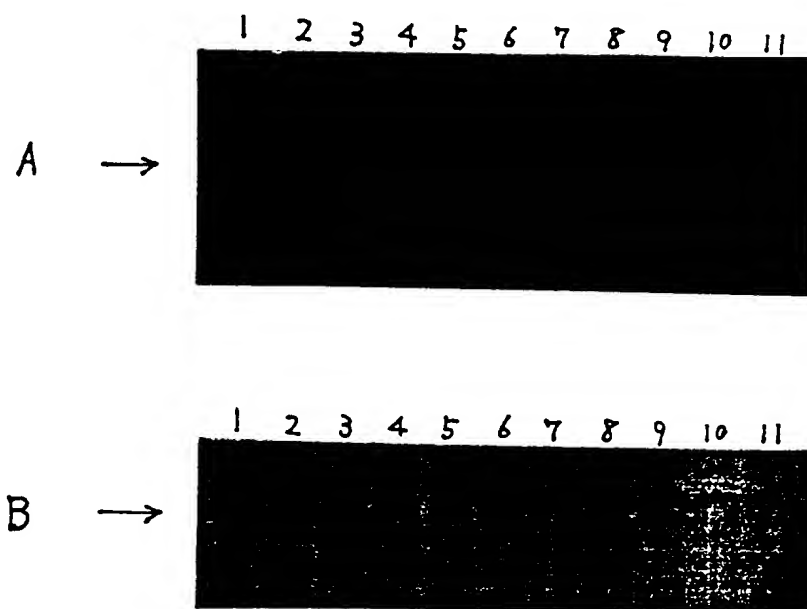


FIG. 16A

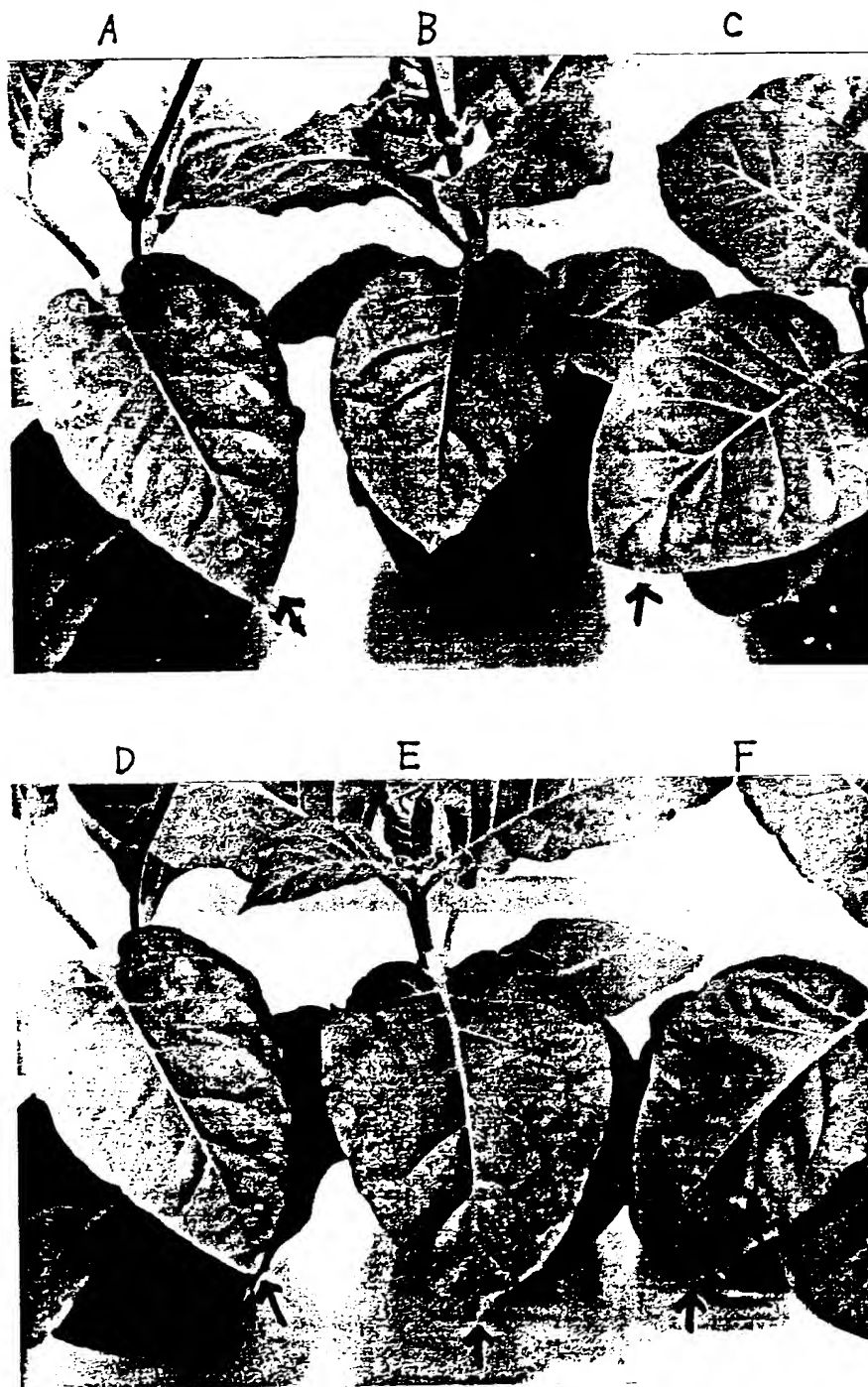


FIG. 16B

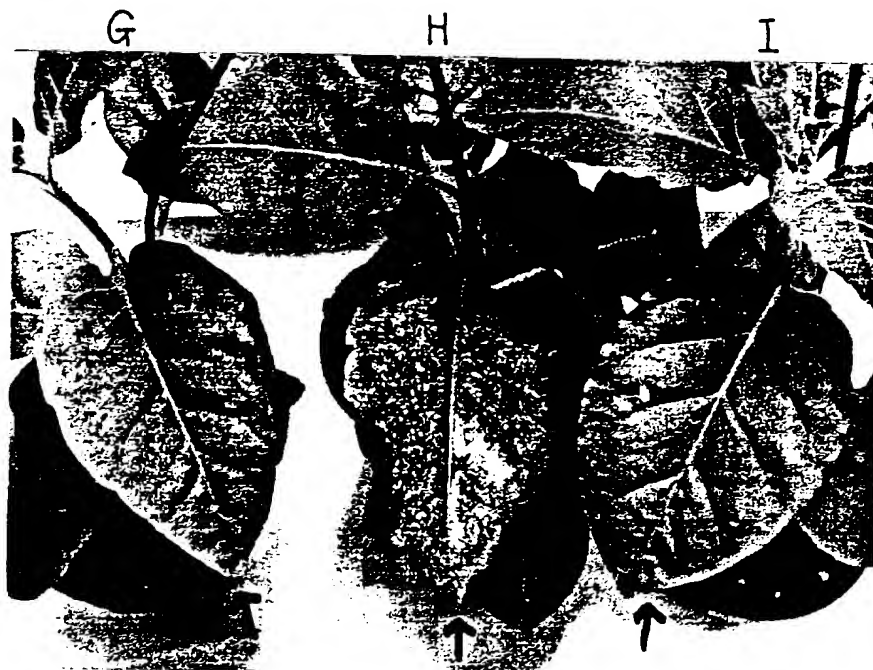


FIG. 17A

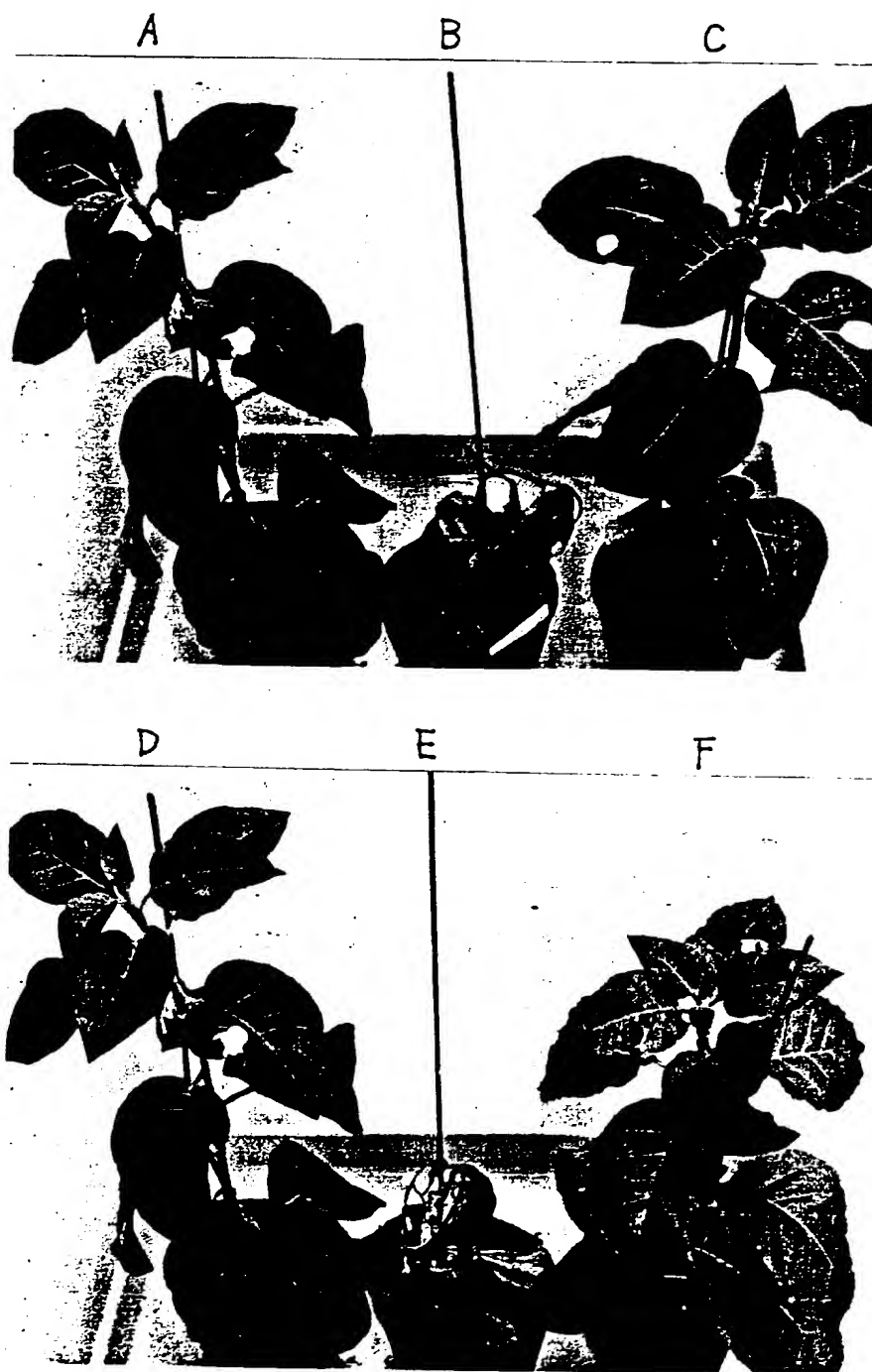


FIG. 17B

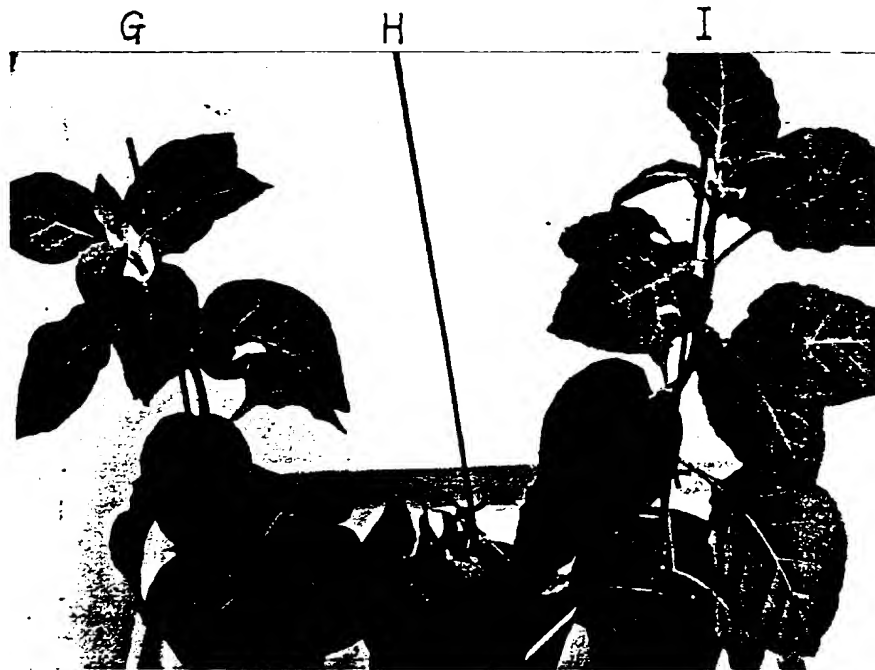


FIG. 18

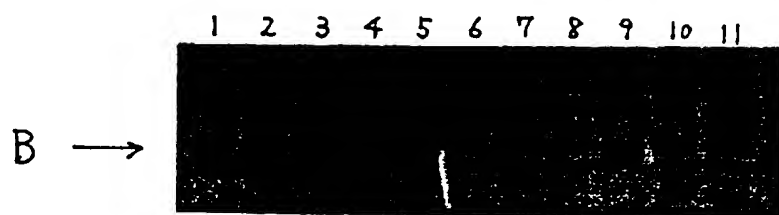
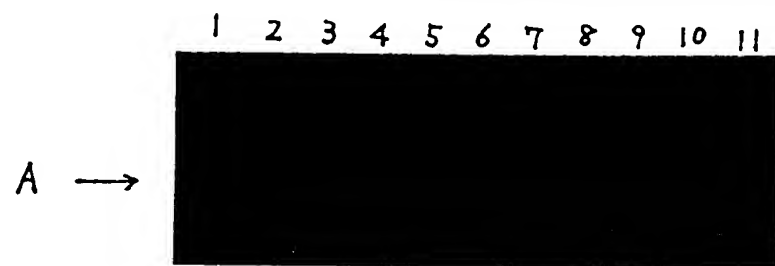


FIG. 19A

5'	ATG	GAA	CTC	AGA	TAT	ACC	CCG	GCC	GGG	TCT	CTA	GAC	AAG	TTC	ATC	CAA	GTC	CAC	54
	M	E	L	R	Y	T	P	A	G	S	L	D	K	F	I	Q	V	H	
	CTC	CTG	CCA	AAC	GAA	GAA	TTC	AGC	ACG	CAG	GTC	CAA	GAA	GCC	ATC	GAC	ATC	ATC	108
	L	L	P	N	E	E	F	S	T	Q	V	Q	E	A	I	D	I	I	
	TGC	ACT	TTC	CTG	AAG	GAA	AAG	TGT	TTC	CGA	TGT	GCC	CCT	CAC	AGA	GTT	CGG	GTG	162
	C	T	F	L	K	E	K	C	F	R	C	A	P	H	R	V	R	V	
	TCC	AAA	GTT	GTG	AAG	GGC	GGC	TCC	TCA	GGC	AAA	GGC	ACG	ACC	CTC	AGG	GGA	CGA	216
	S	K	V	V	K	G	G	S	S	G	K	G	T	T	L	R	G	R	
	TCA	GAT	GCT	GAC	CTC	GTC	GTC	TTC	CTC	ACC	AAT	CTC	ACA	AGT	TTT	CAG	GAA	CAG	270
	S	D	A	D	L	V	V	F	L	T	N	L	T	S	F	Q	E	Q	
	CTT	GAG	CGC	CGA	GGA	GAA	TTC	ATT	GAA	GAA	ATC	AGG	AGA	CAG	CTG	GAA	GCC	TGT	324
	L	E	R	R	G	E	F	I	E	E	I	R	R	Q	L	E	A	C	
	CAA	AGA	GAG	GAA	ACA	TTT	GAA	GTG	AAG	TTT	GAG	GTC	CAG	AAA	CGG	CAA	TGG	GAG	378
	Q	R	E	E	T	F	E	V	K	F	E	V	Q	K	R	Q	W	E	

F I G. 1 9 B

AAT	CCC	387	CGC	GCT	CTC	396	AGC	TTT	GTG	405	CTG	AGG	TCC	414	CCC	AAG	CTC	423	AAC	CAG	GCG	432	GTG
N	P	R	A	L	S	F	V	L	R	S	P	K	L	N	Q	A	V						
GAG	TTC	441	TAT	GTC	CTG	450	CCC	GCC	TTT	459	GAT	GCC	CTA	468	GGT	CAG	TTG	477	ACC	AAA	GGT	486	TAC
E	F	Y	V	L	P	A	F	D	A	L	G	Q	L	T	K	G	Y						
AGA	CCT	495	GAC	TCT	AGA	504	GTC	TAT	GTC	513	CGG	CTC	ATC	522	CAA	GAG	TGC	531	GAG	AAC	CTG	540	AGG
R	P	D	S	R	V	Y	V	R	L	I	Q	E	C	E	N	L	R						
AGA	GAG	549	GGC	GAG	TTC	558	TCC	CCC	TGC	567	TTC	ACG	GAG	576	CTG	CAG	CGA	585	GAC	TTC	CTG	594	AAG
R	E	G	E	F	S	P	C	F	T	E	L	Q	R	D	F	L	K						
AAT	CGT	603	CCA	ACC	AAG	612	CTG	AAG	AAC	621	CTC	ATC	CGC	630	CTG	GTG	AAG	639	CAC	TGG	TAC	648	CAA
N	R	P	T	K	L	K	N	L	I	R	L	V	K	H	W	Y	Q						
CTG	TGT	657	AAG	GAG	CAG	666	CTT	GGA	AAG	675	CCA	TTG	CCC	684	CCA	CAA	TAT	693	GCT	CTG	GAG	702	CTT
L	C	K	E	Q	L	G	K	P	L	P	P	Q	Y	A	L	E	L						

FIG. 19C

CTG	ACG	711 GTC	TAT	GCC	720 TGG	GAA	CAA	729 GGA	TGC	AAT	738 AAA	ACA	GGA	747 TTC	ATC	ACA	756 GCT
L	T	V	Y	A	W	E	Q	G	C	N	K	T	G	F	I	T	A
CAG	GGA	765 TTT	CAG	ACT	774 GTC	TTG	AAA	783 TTA	GTC	CTA	792 AAG	TAT	CAG	801 AAG	CTT	TGC	810 ATC
Q	G	F	Q	T	V	L	K	L	V	L	K	Y	Q	K	L	C	I
TAC	TGG	819 GAA	AAG	AAC	828 TAT	AAC	TCT	837 GAA	AAC	CCT	846 ATT	ATT	GAA	855 GAA	TAT	CTG	864 ACG
Y	W	E	K	N	Y	N	S	E	N	P	I	I	E	E	Y	L	T
AAG	CAA	873 CTT	GCA	AAA	882 CCC	AGG	CCT	891 GTG	ATT	CTG	900 GAC	CCG	GCG	909 GAC	CCT	ACA	918 GGA
K	Q	L	A	K	P	R	P	V	I	L	D	P	A	D	P	T	G
AAT	GTT	927 GCT	GGT	AAA	936 GAC	GCA	TAT	945 AGC	TGG	GAA	954 CGG	CTT	GCA	963 CGA	ACG	GCT	972 TTG
N	V	A	G	K	D	A	Y	S	W	E	R	L	A	R	T	A	L
GTC	TGG	981 CTG	GAT	TAC	990 CCG	TGC	TTT	999 AAG	AAA	TGG	1008 GAT	GGG	TCT	1017 CCC	GTG	GGC	1026 TCC
V	W	L	D	Y	P	C	F	K	K	W	D	G	S	P	V	G	S

FIG. 19D

		1035			1044			1053			1062			1071			1080
TGG	GAT	GTG	TCG	CCC	CAA	GAA	CAC	AGT	GAC	CTG	ATG	TTC	CAG	GCC	TAT	GAT	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
W	D	V	S	P	Q	E	H	S	D	L	M	F	Q	A	Y	D	F
		1089			1098			1107			1116			1125			1134
AGA	CAG	CAC	TAT	AGA	CCC	TCT	CCA	GGA	ATC	CAG	TTC	CAC	GGA	GGA	GCC	TCT	CCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	Q	H	Y	R	P	S	P	G	I	Q	F	H	G	G	A	S	P
		1143			1152			1161			1170						
CAG	GTG	GAA	GAG	AAC	TGG	ACA	TGT	ACC	ATC	CTC	TGA	3'					
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
Q	V	E	E	N	W	T	C	T	I	L	*						

FIG. 20A

5'	ATG	GAG	ACT	GAG	AGC	CAT	AAC	AAC	CCT	CAG	GAA	AGA	CCC	ACA	CCC	TCT	AGT	AAT	54
	M	E	T	E	S	H	N	N	P	Q	E	R	P	T	P	S	S	N	
	GGG	AAG	GCT	TCA	ATG	GGA	GAC	AAT	CAT	TCG	TTG	ATT	AAA	GCT	GTT	AGA	GAT	GAA	108
	G	K	A	S	M	G	D	N	H	S	L	I	K	A	V	R	D	E	
	GAC	ATT	GAG	TCG	GTC	CAG	CAA	TTG	CTA	GAA	AGA	GGG	GCT	GAT	GTC	AAT	TTC	CAG	162
	D	I	E	S	V	Q	Q	L	L	E	R	G	A	D	V	N	F	Q	
	GAA	GAA	TGG	GGC	TGG	TCA	CCT	TTG	CAT	AAT	GCA	GTA	CAA	GTT	GAC	AGA	GAG	GAC	216
	E	E	W	G	W	S	P	L	H	N	A	V	Q	V	D	R	E	D	
	ATT	GTG	GAA	CTT	CTG	CTT	AGT	CAT	GGT	GCT	GAG	CCT	TGT	CTG	CGG	AAG	AAG	AAT	270
	I	V	E	L	L	L	S	H	G	A	E	P	C	L	R	K	K	N	
	GGG	CCC	ACT	CCC	TTC	ATC	ATT	GCT	GGG	ATT	GTG	GGA	AAC	GTG	AAG	TTG	CTC	AAA	324
	G	A	T	P	F	I	I	A	G	I	V	G	N	V	K	L	L	K	
	CTA	TTA	CTT	CCT	AAA	GTA	ACA	GAT	GTC	AAT	GAG	TGT	GAT	GTT	AAT	GGC	TTC	ACA	378
	L	L	L	P	K	V	T	D	V	N	E	C	D	V	N	G	F	T	

FIG. 20B

GCT	TTC	387	ATG	GAA	GCT	396	GCT	GTG	TAT	405	GGC	AAA	GTC	414	GAA	GCC	TTA	423	AGA	TTC	CTG	432	TAT
A	F	M	E	A	A	V	Y	G	K	V	E	A	L	R	F	L	Y						
AAC	AAC	441	GGA	GCA	GAG	450	GTG	AAT	TTG	459	CAC	AGA	AAG	468	ACA	ATA	GAG	477	GAT	CAA	GAG	486	AGG
N	N	G	A	E	V	N	L	H	R	K	T	I	E	D	Q	E	R						
GTT	AAG	495	AAA	GGA	GGG	504	GCC	ACT	GCT	513	CTC	ATG	GAT	522	GCT	GCT	AGA	531	AGA	GGG	CAT	540	GTA
V	K	K	G	G	A	T	A	L	M	D	A	A	R	R	G	H	V						
GAT	GTC	549	GTA	GAG	ATC	558	CTC	CTT	CAT	567	GAG	ATG	GGG	576	GCA	GAT	GTC	585	AAT	GCT	CGG	594	GAC
D	V	V	E	I	L	L	H	E	M	G	A	D	V	N	A	R	D						
AAT	AGG	603	GGC	AGA	AAT	612	GCT	TTA	ATC	621	TAT	GCT	CTT	630	CTG	AAC	TCT	639	GAT	GAT	GAG	648	AAG
N	R	G	R	N	A	L	I	Y	A	L	L	N	S	D	D	E	K						
GTG	AAA	657	GTG	AAA	GCN	666	ACT	ACT	CGC	675	CTT	CTG	CTG	684	GAC	TAT	AAG	693	GTT	GAT	GTC	702	AAT
V	K	V	K	A	T	T	R	L	L	L	D	Y	K	V	D	V	N						

FIG. 20C

GTG	AGG	711	GGG	GAA	GGA	720	AGG	AAG	ACG	729	CCG	CTG	ATC	738	TTG	GCA	GTG	747	GAA	AAG	AAG	756	AAC
V	R	G	E	G	R	K	T	P	L	I	L	A	V	E	K	K	N						
CTG	GAT	765	CTG	GTG	CAG	774	ATG	CTT	CTG	783	GAA	CAA	ACA	792	GCT	ATA	GAG	801	ATT	AAT	GAC	810	ACA
L	D	L	V	Q	M	L	L	E	Q	T	A	I	E	I	N	D	T						
GAC	AGT	819	GAG	GGT	AAA	828	ACA	GCA	CTG	837	CTG	CTT	GCT	846	GTC	GAG	CTC	855	AAG	CTG	AAG	864	GAA
D	S	E	G	K	T	A	L	L	L	A	V	E	L	K	L	K	E						
ATT	GCC	873	CAG	TTG	CTG	882	TGT	CGC	AAA	891	GGA	GCC	AGC	900	ACA	AAA	TGC	909	GGG	GAC	CTC	918	GTC
I	A	Q	L	L	C	R	K	G	A	S	T	K	C	G	D	L	V						
GCA	ATA	927	GCG	AAG	CGC	936	AAT	TAT	GAC	945	TCT	GAC	CTT	954	GCA	AAG	TTC	963	CTT	CGC	CAG	972	CAT
A	I	A	K	R	N	Y	D	S	D	L	A	K	F	L	R	Q	H						
GGA	GCT	981	GTA	GAA	GAC	990	GTT	TGC	CCT	999	CCT	GCT	AAA	1008	GCC	TGG	AAG	1017	CCT	CAG	AGC	1026	TCA
G	A	V	E	D	V	C	P	P	A	K	A	W	K	P	Q	S	S						
CGT	TGG	1035	GGG	GAG	GCC	1044	CTG	AAA	CAT	1053	CTT	CAC	AGG	1062	ATA	TAC	CGC	1071	CCT	ATG	ATA	1080	GGC
R	W	G	E	A	L	K	H	L	H	R	I	Y	R	P	M	I	G						

FIG. 20D

1089	1098	1107	1116	1125	1134
AAA CTC AAG ATC	TTT ATT GAT	GAA GAA TAT	AAA ATC GCT	GAC ACT TCC	CAA GGG
K L K I F I D	E E Y K I A D	T S Q G			
1143	1152	1161	1170	1179	1188
GGC ATC TAC CTG	GGG TTA TAT	GAG GAA CAA	GAG GTA GCT	GTG AAG CGG	TTC CCT
G I Y L G L Y	E E Q E V A V	K R F P			
1197	1206	1215	1224	1233	1242
AAA GGC AGC ACA	CGG GGA CAA	AAT GAA GTC	TCT TGT TTG	CAG AGC AAC	CGA GCC
K G S T R G Q	N E V S C L Q	S N R A			
1251	1260	1269	1278	1287	1296
AAT GGT CAC GTG	GTG ACG TTC	TAT GGC AGT	GAG AGC GAC	AGG ACC TGT	CTG TAT
N G H V V T F	Y G S E S D R	T C L Y			
1305	1314	1323	1332	1341	1350
GTG TGC CTT GCC	CTG TGT GAG	CAC ACG CTG	GAG AAG CAC	TTG GAC GAC	CGC AAA
V C L A L C E	H T L E K H L	D D R K			
1359	1368	1377	1386	1395	1404
GGA GAG GCT GTG	CAA AAC AAG	GAA GAT GAA	TTT GCC CGC	AAC ATC CTC	TCA TCT
G E A V Q N K	E D E F A R N	I L S S			
1413	1422	1431	1440	1449	1458
CTG TTT AAG GCT	GTT GAG GAA	CTA CAC CGG	TCT GGA TAC	ACT CAT CAG	GAT CTG
L F K A V E E	L H R S G Y T	H Q D L			

FIG. 20E

1467	1476	1485	1494	1503	1512
CAA CCG CAG AAC ATC TTA ATA GAT TCC AAG AAT GGT GCT TGC CTG GCA GAT TTT					
Q P Q N I L I D S K N G A C L A D F					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
GAT AAA AGC GTC AAG GGG ACT GGA GAT CCA CAG GAA ATC AAG AGA GAT CTA GAG					
D K S V K G T G D P Q E I K R D L E					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
GCC CTG GGA CTG CTG GTC CTA TAT GTG GTA AAA AAG GGA AAT GAT TCT TTT GAG					
A L G L L V L Y V V K K G N D S F E					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
ATG CTG AAG AAT CTA AGA ACT GAA GAG TTG ATT GAG CGT TCT CCA GAT AAG GAA					
M L K N L R T E E L I E R S P D K E					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACT CGG GAC CTC ATT CGG CAT CTG TTA GTC CCT GGG GAC AAT GTG AAG GGC CAT					
T R D L I R H L L V P G D N V K G H					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
CTG AGT GGC CTG CTG GCT CAT CCC TTC TTT TGG AGT TGG GAG AGC CGC TAC CGG					
L S G L L A H P F F W S W E S R Y R					
1791	1800	1809	1818	1827	1836
ACC CTA CGG GAT GTG GGA AAC GAA TCT GAC ATC AAA ACA CGA AAT ACT AAT GGC					
T L R D V G N E S D I K T R N T N G					

FIG. 2 OF

1845	1854	1863	1872	1881	1890
AAG ATC CTC	CAG CTT CTG	CAA CCT GAA	ACA TCT GAA	CTT CCA AGT	TTT GCC CAG
---	---	---	---	---	---
K I L	Q L L	Q P E	T S E	L P S	F A Q
1899	1908	1917	1926	1935	1944
TGG ACA ATT	GAG GTT GAC	AAA TCT GTG	ATG AAA ATG	AAT ACC	TAT CAG AAC
---	---	---	---	---	---
W T I	E V D	K S V	M K K	M N T	Y Q N
1953	1962	1971	1980	1989	1998
ACT GTA GGT	GAC CTG CTG	AAG TTC ATC	CGG AAT GTG	GGA GAG CAC	ATT AAT GAA
---	---	---	---	---	---
T V G	D L L	K F I	R N V	G E H	I N E
2007	2016	2025	2034	2043	2052
CAA AAG AAT	ATA GAG ATG	AAG TCA AAA	ATT GGA GAA	CCT TCC CAG	TAT TTT CAG
---	---	---	---	---	---
Q K N	I E M	K S K	I G E	P S Q	Y F Q
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GAG AAA TTT	CCA GAT CTG	GTC ATG TAT	GTC TAT AAA	AGA CTA CAG	AAC ACA GAA
---	---	---	---	---	---
E K F	P D L	V M Y	V Y K	R L Q	N T E
2115	2124	2133	2142	2151	
TAT GCA AAG	CAT TTT CCA	AAA AAT CTC	AAC CTG AAC	AAA CCC GAC	GTG TGA 3'
---	---	---	---	---	---
Y A K	H F P	K N L	N L N	K P D	V *

FIG. 21

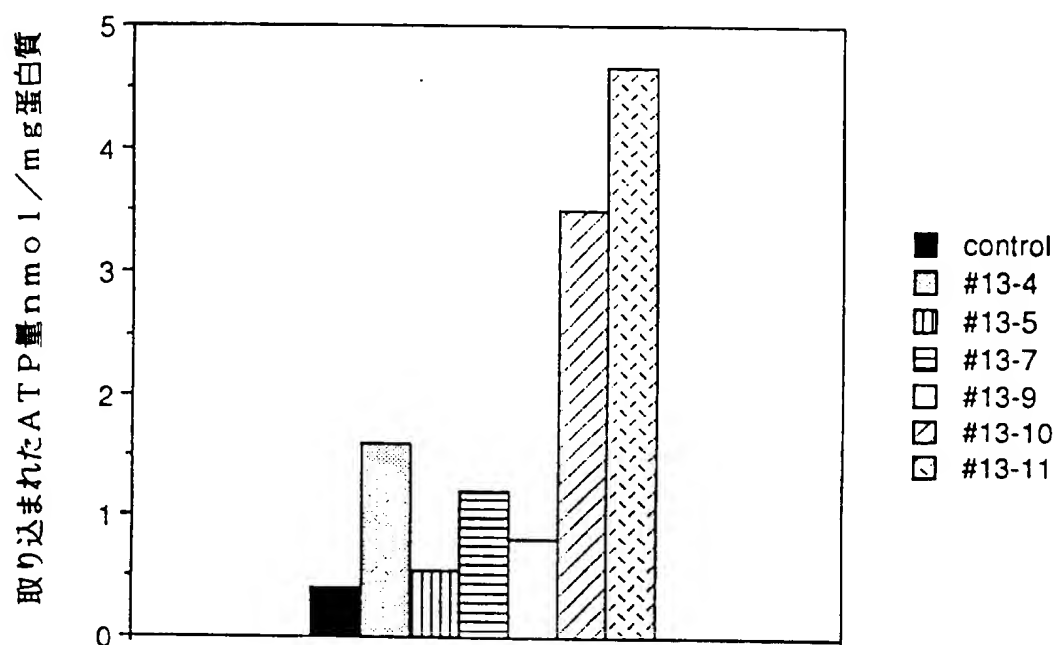


FIG. 22

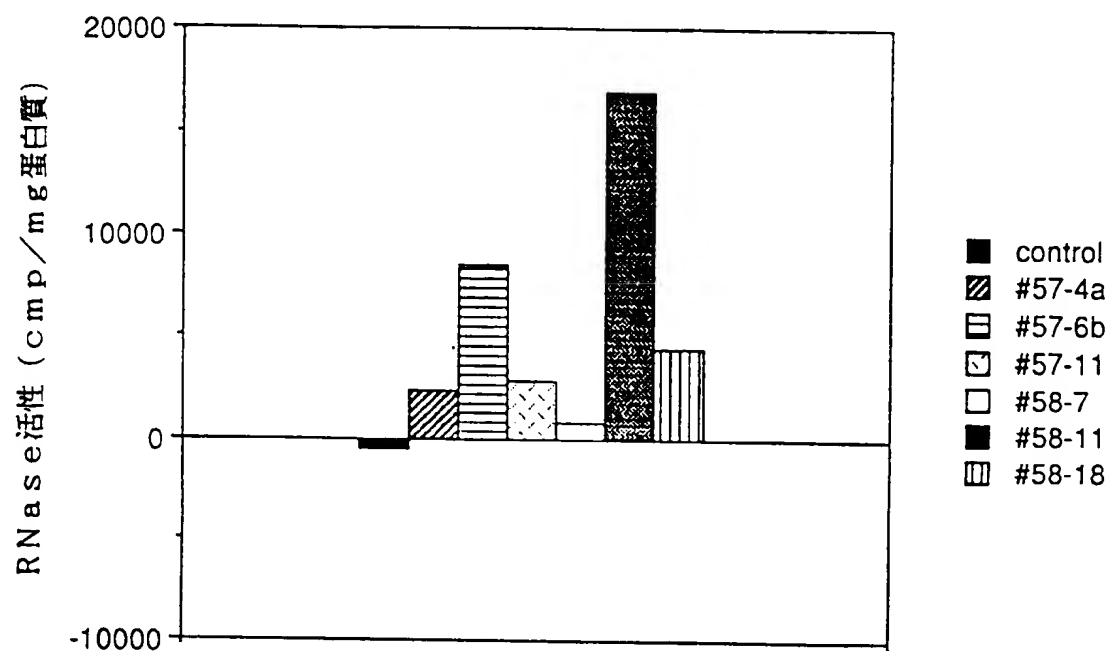


FIG. 23

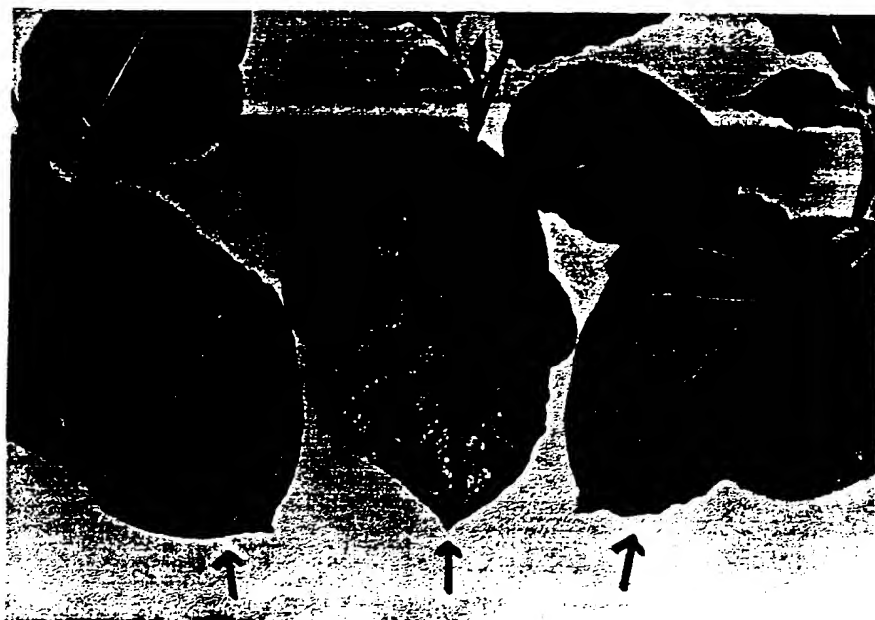
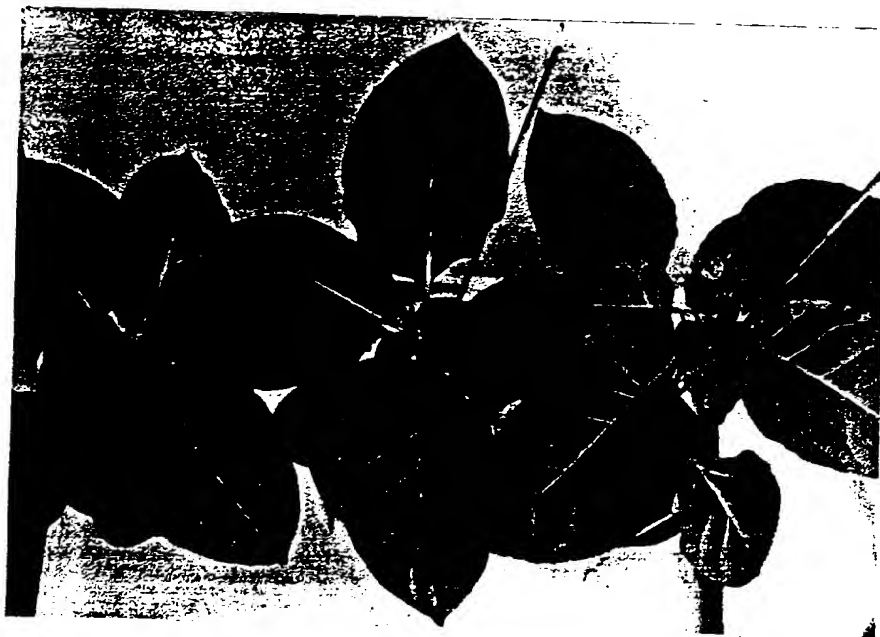


FIG. 24



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A01H5/00, A01H1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST File on Science and Technology
BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 93/20686, A1 (Kirin Brewery Company, Ltd.), May 28, 1993 (28. 05. 93) & EP, 592685, A1 & US, 5491080, A	1 - 9
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, No. 10, 1989, Schroder H. C., Wenger R., Kuchino Y., Muller W. E. G., p. 5669-5673	1 - 9
	"Biochemistry Encyclopedia" (2nd edit.), By Tokyo Kagaku Dojin, November 22, 1990 (22. 11. 90),	
Y	p. 236, Section of (2'-5')oligoadenylate	1 - 9
Y	p. 1423, Section of ribonuclease L	1 - 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 9, 1996 (09. 08. 96)

Date of mailing of the international search report

August 27, 1996 (27. 08. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A 01 H 5 / 00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A 01 H 5 / 00, Int. Cl¹ A 01 H 1 / 00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

J I C S T 科学技術文献ファイル、
B I O S I S P R E V I E W S

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 93/20686, A1 (麒麟麦酒株式会社) 28. 5月. 1993 (28. 05. 93) & EP, 592685, A1 & US, 5491080, A	1-9
Y	The Journal of Biological Chemistry, volume 264, no.10, 1989, Schroder H.C., Wenger R., Kuchino Y., Muller W.E.G. p.5669-5673 「生化学事典」(第2版), 東京化学同人発行, 22. 11月. 1990 (22. 11. 90)	1-9
Y	p.236, (2'-5')オリゴアデニル酸 ((2'-5')oligoadenylate) の欄	1-9
Y	p.1423, リボヌクレアーゼ L (ribonuclease L) の欄	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 08. 96

国際調査報告の発送日

27.08.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

郡山 順

2 B | 9 4 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3238